



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**PŘÍPRAVA, CHARAKTERIZACE TRIMETHYLCHITOSANU
A OVĚŘENÍ JEHO INTERAKČNÍCH SCHOPNOSTÍ VŮČI
VARIABILNĚ NABITÝM IONTOVÝM SLOUČENINÁM**

PREPARATION, CHARACTERIZATION OF TRIMETHYLCHITOSAN AND VERIFICATION OF ITS
INTERACTION ABILITY WITH REGARDS TO VARIABLE CHARGED IONIC COMPOUNDS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Zuzana Bayerová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jiří Smilek, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1371/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Zuzana Bayerová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Jiří Smilek, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Příprava, charakterizace trimethylchitosanu a ověření jeho interakčních schopností vůči variabilně nabitým iontovým sloučeninám

Zadání bakalářské práce:

- 1) Nastudovat současný stav řešené problematiky a na základě toho vypracovat literární rešerši na téma přípravy trimethylchitosanu a jeho schopnosti interakce.
- 2) Navrhnout postupy vhodné pro přípravu trimethylchitosanu a následně provést syntézu trimethylchitosanu.
- 3) Provést základní charakterizaci trimethylchitosanu pomocí vhodných fyzikálně–chemických metod.
- 4) Experimentálně ověřit možnosti interakce trimethylchitosanu s variabilně nabitými sloučeninami.
- 5) Diskutovat výsledky a vyvozovat logické závěry.

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Zuzana Bayerová
student(ka)

Ing. Jiří Smilek, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Cílem předložené bakalářské práce je studium interakcí trimethylchitosanu s opačně nabitými látkami s ohledem na jeho potenciální biomedicínské využití. Podstatným krokem před samotným studiem interakcí byla úspěšná syntéza trimethylchitosanu, která byla následně potvrzena charakterizací finálního produktu syntézy pomocí fyzikálně-chemických metod (infračervená spektroskopie, elementární analýza, nukleární magnetická rezonance). Výsledný produkt byl podroben interakcím se záporně nabitými látkami, jimiž byly dodecylsírany sodný jakožto zástupce ionogenního tenzidu, alginát coby zástupce přírodního polysacharidu a Chicago Blue jako zástupce anionaktivního barviva. Schopnost interakcí s dodecylsírany sodným a alginátem byla prokázána tvorbou hydrogelů, které byly následně charakterizovány z hlediska mechanických vlastností pomocí klasických viskoelastických testů na reometru. Pozitivní afinita trimethylchitosanu vůči organickým barvivům byla zkoumána v podpůrných hydrogelových maticích na bázi agarózy z hlediska změny transportních a bariérových vlastností.

ABSTRACT

The aim of this thesis is to study the interactions of trimethylchitosan with oppositely charged substances with regard to its potential biomedical use. A substantial step before the study of interactions was a successful synthesis of trimethylchitosan, which was subsequently confirmed by characterization of the final synthesis product using physico-chemical methods (infrared spectroscopy, elemental analysis, nuclear magnetic resonance). The result product was subjected to negatively charged interactions such as sodium dodecyl sulphate as a representative of the ionic surfactant, alginate as a natural polysaccharide representative and Chicago Blue as a representative of the anionic dye. The ability to interact with sodium dodecyl sulfate and alginate was demonstrated by the formation of hydrogels, which were subsequently characterized by mechanical viscosity tests using rheometric properties. The positive affinity of trimethylchitosan for organic dyes has been investigated in agarose-based support hydrogel matrices for changes in transport and barrier properties.

KLÍČOVÁ SLOVA:

trimethylchitosan, interakce, hydrogel, reologie, transportní vlastnosti

KEY WORDS:

trimethylchitosan, interaction, hydrogel, rheology, transport properties

BAYEROVÁ, Z. *Příprava, charakterizace trimethylchitosanu a ověření jeho interakčních schopností vůči variabilně nabitým iontovým sloučeninám*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2019. 45 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Jiří Smilek, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být použita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému vedoucímu práce Ing. Jiřímu Smilkovi Ph.D. a konzultantce Bc. Janě Szabové slovy, jež pro ně složil Pokáč:

*Díky, slečno konzultantko,
díky, pane vedoucí,
za to, že jste provedli mě
skrze peklo horoucí!*

Dále děkuji všem, co se jakkoliv podíleli na syntéze, charakterizaci či interakcích TMC.

Obsah

ABSTRAKT	3
1 ÚVOD	6
2 TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1 Chitosan.....	7
2.1.1 Vlastnosti.....	8
2.1.2 Využití.....	9
2.2 Trimethylchitosan.....	11
2.2.1 Vlastnosti.....	11
2.2.2 Využití.....	12
2.3 Výhody trimethylchitosanu v porovnání s chitosanem	13
2.4 Tenzidy.....	14
2.4.1 Rozdělení tenzidů.....	16
3 CÍL PRÁCE	17
4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	18
4.1 Příprava methylovaného chitosanu	18
4.2 Interakce TMC s opačně nabitými látkami pro biomedicínské aplikace	21
5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
5.1 Použité chemikálie	23
5.2 Průběh syntézy TMC.....	24
5.3 Charakterizace připraveného trimethylchitosanu	26
5.3.1 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací.....	26
5.3.2 Elementární analýza	26
5.3.3 Nukleární magnetická rezonance	27
5.4 Příprava hydrogelů na bázi TMC	28
5.5 Charakterizace hydrogelů pomocí oscilačních testů	29
5.6 Příprava vzorků na transportní experimenty	29
6 DISKUZE A VÝSLEDKY	32
6.1 Charakterizace nasyntetizovaného trimethylchitosanu	32
6.2 Charakterizace hydrogelů.....	35
7 ZÁVĚR.....	42
8 POUŽITÁ LITERATURA	43

1 ÚVOD

Chitosan je kladně nabitý polysacharid s unikátními vlastnostmi. Unikátními jsou především z toho důvodu, že jako jeden z mála polysacharidů je v roztoku kladně nabitý a z tohoto důvodu je tolik ceněný. Běžně je většina těchto „vysokomolekulárních přírodních látek“ záporně nabitá (alginát, glukóza, ...). Vyznačuje se všestrannými schopnostmi, jakými jsou biokompatibilita, možnost úplné biologické rozložitelnosti a nízká toxicita. Pro blahodárné účinky je využíván v mnoha odvětvích a je velmi vyhledávanou látkou jako například v medicínském užití či potravinářství. Jeho hlavní nevýhodou je ovšem nerozpustnost ve vodných roztocích s neutrálním či mírně zásaditým prostředím. Již zmíněná nerozpustnost je hlavním limitujícím faktorem v komplexnějším aplikačním využití (např. farmaceutický průmysl a příbuzných biomedicínských oborech).

V poslední době řada výzkumů uvádí modifikace chitosanu a to alkylací, acylací, karboxymethylací, N-fosfonomerací za účelem výše uvedené limitující faktory překonat. Tato bakalářská práce si klade za cíl laboratorně nasyntetizovat trimethylchitosan, který je kvarternizován derivátem chitosanu. Namethylováním chitosanu bude chitosan zbaven limitujícího faktoru nerozpustnosti a nabyde mnohých dalších žádoucích vlastností.

N, N, N – trimethylchitosan má mukoadhezivní povahu a nese kladný náboj, což jsou základní předpoklady pro vhodný nosič léčiv. Interakcí kladně nabitého trimethylchitosanu se záporně nabitým protějškem získáváme gelové systémy s potenciálním využitím v medicínských aplikacích. Využití tohoto systému nachází své uplatnění i u nosičů léčiv, které se vyznačují svým pomalým uvolňováním účinné látky, zvýšenou rozpustností a cíleným podáváním.

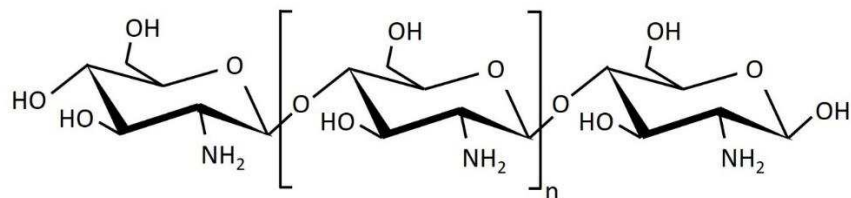
Hlavním cílem této práce je prokázání interakcí s variabilně nabitými sloučeninami. Pro tyto účely jsou využity difúzní procesy v hydrogelových maticích prokazující interakci trimethylchitosanu s opačně nabitými sloučeninami. Byly navrženy jednoduché podmínky, jež co nejdůvěryhodněji simulují přirozené podmínky při prostupu léčiv. Porovnáváním transportních vlastností kladně/záporně nabitých barviv s kladně nabitým trimethylchitosanem v gelu dokážeme posoudit reaktivitu a bariérové vlastnosti tohoto unikátního materiálu. Další stěžejní metodou práce je reologie, jež zaštiťuje pochopení mechanických vlastností připravených gelů a možnost stanovit jejich ideální metodu přípravy. Kombinací zvolených metod jsme schopni nastínit ideální podmínky pro přípravu gelů na bázi trimethylchitosan se záporně nabitou protilátkou.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Chitosan

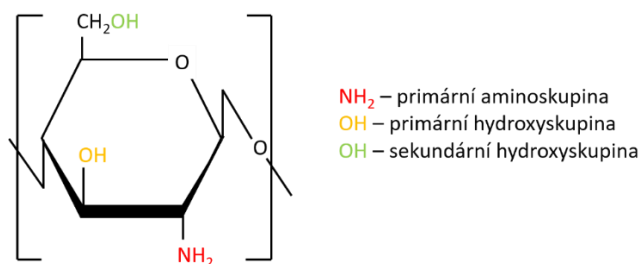
Chitosan je přírodní polysacharid, který vznikl deacetylací chitinu. V porovnání s chitinem vykazuje větší chemickou reaktivitu, což je způsobeno právě odstraněním acetylových skupiny. Čím vyšší stupeň deacetylace, tím roste interakční potenciál, a proto se pro biomedicínské aplikace používá chitosan se stupněm vyšším v rozmezí 75 – 98 % [1].

Jeho struktura je tvořena z glukosaminových a N-acetylglukosaminových monomerů spojených pomocí β -glykosidických vazeb. Každá z opakujících se jednotek v řetězci chitosanu obsahuje tři nukleofilní funkční skupiny, a to právě na druhém uhlíku skupinu NH_2 a na třetím a šestém uhlíku skupinu OH . Modifikace chitosanu využívají právě těchto nukleofilních skupin a mají za následek vznik derivátů obsahujících kationtové, hydrofobní (trimethyl), či hydrofilní skupiny (oleoyl). Zavedením kationtových skupin dosáhneme vyšší rozpustnosti a antimikrobiální aktivity chitosanu, zatímco zavedením hydrofobních skupin rozpustnost roste při nižší M_r a antimikrobiální vlastnosti se nemění [1] [2].



Obrázek 1: Struktura chitosanu

Jeho polymerní kostra se sestává především z hydrofilních funkčních skupin. Struktura **kationtového bazického** biopolymeru s $\text{pK}_a \sim 6,5$ nese pozitivní náboj v kyselém prostředí. Tento kationaktivní polysacharid má díky své struktuře možnost interagovat s negativně nabitými sloučeninami. Obsahuje volné aminoskupiny, jež jsou ochotny vázat ionty kovů a tvořit tak unikátní polysacharidy. Toto chování vykazuje ve vodných roztocích [2].



Obrázek 2: Významné funkční skupiny chitosanu

Fyzikálně-chemické vlastnosti chitosanu mohou být dále vylepšeny **modifikací funkčních skupin** postranních řetězců, a to například zavedením skupin do polymerního řetězce, které mají za následek trvalé nabití tohoto polymeru (jimiž je například methylová skupina). Právě díky těmto interakcím s primární aminoskupinou a také primární a sekundární hydroxyskupinou se stává zajímavým a stále zkoumanějším objektem. Vykazuje vlastnosti, které mají široké pole působnosti nejen v chemii, ale i jiných oblastech [1].

2.1.1 Vlastnosti

Chitosan je **nerozpuštěný ve vodě** a ve většině organických rozpouštědel, je však rozpustný v zředěných kyselinách (mravenčí, octové, citrónová). Již zmíněná aminoskupina dodává možnost interakcí a snadno podléhá kvarternizaci, čímž lze zvýšit rozpustnost chitosanu ve vodě. Dále pak hydroxyskupina bývá nejčastěji substituována spojovacími články „spacery“, na které se váže aktivní látka, která je zodpovědná za cílení léčiva, nebo se zde váže přímo léčivo. Posledním reaktivním místem je *sekundární hydroxyskupina*, jejíž modifikace je významná hlavně díky rozpustnosti ve vodě [3].

Mezi přednosti chitosanu patří to, že je **netoxický, biokompatibilní, bioaktivní a biodegradabilní**. Z tohoto důvodu je možné chitosan v protonované formě využít pro paracelulární transport hydrofilních léčiv. V kombinaci bioadheze a schopnosti rozšířit těsné buněčné spoje v membráně (tight junction) [4] [5] se jedná o ideální nosič léčiv. Dle hypotézy jsou však lepší alternativou deriváty s jinými substituenty a jinou bazicitou, což by přineslo vyšší účinnost transportu hydrofilních léčiv. Je známo, že přenos terapeutických sloučenin je preferovanější ve více bazických prostředích. Poslední studie ukázaly **protinádorovou účinnost** chitosanu. V závislosti na molekulové hmotnosti je chitosanu schopen potlačit růst buněk adenokarcinomu [3].

Čistý chitosan vykazuje **protizánětlivé a antimikrobiální účinky**. Svou nízkou afinitu k enzymu degraduje pomaleji než chitosan méně čistý, který naopak vyšší afinitou způsobuje sebedestrukci. Apoptóza bakteriální buňky je zapříčiněna změnou negativního náboje. Kladně nabitý chitosan interaguje s aniontovými složkami nebo s negativní nábojovou hustotou a mění tím funkci a permeabilitu buňky. Protizánětlivý charakter je však omezen hodnotou pH, která musí být nižší než 6. Toto kritérium znemožňuje aplikace a studie bioaktivity v neutrálních a fyziologických podmínkách. Aby bylo omezení překonáno, je chitosan synteticky modifikován a pro fyziologické účely se používají deriváty mající zvýšenou aktivitu a lepší rozpustnost ve vodě. Mezi nejběžnější funkční skupiny těchto derivátů patří kvartérní amoniové, guanidinylové, karboxyalkylové, hydroxyalkylové, thiolové skupiny a hydrofobní skupiny, jako jsou dlouhé alkylové řetězce a substituované [2] [6].

Nedávný výzkum odhalil **antioxidační a terapeutické účinky**. Chitosan má schopnost indukovat tvorbu cytokinů i přes zvýšenou proliferaci T-lymfocytů a působí tak protinádorově. Navíc díky své rozmanitosti aplikačních forem (filmy, vlákna, perličky, prášek, gel či roztok) je chitosan všestranně použitelný pro účely tkáňového inženýrství, hydrogelových filmů, léčbě kardiovaskulárních onemocnění nebo pro nosičové systémy. Chitosan a jeho deriváty vznikají porézností, velkou reakční plochou, konduktivitou a pevností v tahu [6].

Další z dobrých vlastností je **mukoadhezivní** charakter. Chitosan je jako jeden z mála mukoadheziv, který je polysacharidem kationtového charakteru (většina polysacharidů je neutrální nebo aniontová). Díky aminoskupinám má pozitivní náboj a vznikem vodíkových můstků nebo elektrostatickým působením se složkami mucinové vrstvy na sliznici získává tyto vlastnosti. Na základě mukoadheze podávané lékové formy mají výrazně delší dobu trvání, stálou vysokou koncentraci v místě aplikace a správnou biologickou dostupnost [7].

2.1.2 Využití

Chitosan je jeden z nejčastěji uváděných polymerů ve vědeckém výzkumu, a to hned z několika důvodů. Jeho využití je velice všestranné. Jedná se o vhodný a vysoce funkční materiál s ohledem na jeho vlastnosti – biokompabilitu, biologickou odbouratelnost, netoxicitu a adsorpční vlastnosti. Nespočet kladných vlastností, které jsou navzájem propojeny, se využívají v nejrůznějších odvětvích [8].

Tabulka 1: Vlastnosti chitosanu a jejich uplatnění v oborech [8]

Chemie	Biomedicína	Životní prostředí	Polymery	Farmacie
N-acetylové substituenty	hojení ran	přírodní polymer	adsorpční kapacita	nosičové systémy
N-deriváty	osteogeneze	netoxický	univerzální	řízené uvolňování
jednoduché funkční skupiny	protinádorová aktivita	recyklovatelný z odpadu	mechanické vlastnosti	mikro-/nano-částice
polyelektrolyty	mukoadhezivní	biokompatibilní	gely	povlaky
pozitivní náboj	scaffoldy	biodegradabilní	vrstvy	povrchově aktivní

Pro své jedinečné rysy může chitosan najít uplatnění **ve farmaceutických a biomedicínských odvětvích**. Ideální použití je pro transport léčiv, jehož hlavním znakem je řízené uvolňování a cílení léčiva. Mezi výhody tohoto užití patří optimální odpověď receptoru, minimální vedlejší účinky a prodloužený efekt léčiva. Chitosan jako polymer má charakter nosiče a na něj se biodegradabilní vazbou navázáno léčivo. Tento konjugát polymer-léčivo je pak mnoha způsoby transportován a absorbován. Mezi nejznámější přenosy léčiv patří difúze nebo endocytóza, kdy je léčivo upevňováno v lysosomech působením enzymů. Nosičové systémy se využívají pro hydrogely, tablety, mikrokapsule nebo i obvazy [3].

Biomedicínské přednosti chitosanu se dále uplatňují u obvazových materiálů. Slouží jako ochrana rány před mechanickým poškozením, znečištěním a infekcí. Mimo jiné podporuje regeneraci kůže, urychluje hojení ran a také ránu zvlhčuje. Jelikož se jedná o biomateriál, stehy se stávají vstřebatelnými. Chitosanový obvaz je pevný, pružný, vykazující hojivé účinky a prevenci před bakteriální infekcí [7].

Do farmaceutického využití můžeme zahrnout podporu imunitního systému, protirakovinné účinky, redukci krevní glukózy, jenž má za následek zpomalení rozvoje cukrovky. Dále pak schopnost zabraňování srážení krve se využívá pro operace srdce a dialýzu. Při tkáňovém inženýrství se využívá porézní chitosanové formy a možnosti kompozitních scaffoldů. V očním lékařství se využívají chitosanové materiály z důvodu optické čistoty, mechanické stability, propustnosti pro plyny, smáčlivosti a biokompability. Díky těmto vlastnostem jsme schopni vyrábět kontaktní čočky [7].

Slouží jako antikoagulant. Díky svému kladnému náboji je schopen přitahovat záporně nabitě červené krvinky – erytrocyty. Nahromaděním erytrocytů dochází k vytvoření krevní zátky z červených krvinek. Chitosan pevně přilne k ráně a kontroluje krvácení, což má za následek lokální hojení kůže. Díky lokálnímu působení je dosaženo reepitelace (opětovné tvorbě epitelové tkáně) nebo tvorby granulační tkáně. Vzhledem k tomu, že chitosan inhibuje tvorbu fibroplastů, stává se pokožka celistvou a je zcela bez jizev. Toho se využívá obzvláště u popálenin [7].

V **kosmetice** se chitosanu využívá v přípravcích jako jsou zubní pasty, pleťové krémy či vlasové kosmetice. Tyto produkty jsou vhodné pro citlivou kůži či ochranu vlasů. Vyznačují se zvlhčujícím, antibakteriálním, fungicidním a antielektrostatickým efektem. Dále zlepšuje penetraci lipofilních látek (například vitamínů) kůží [7].

Uplatnění najde i u **potravinových doplňků**. Jedna z praktických vlastností chitosanu je schopnost na sebe vázat tuky a cholesterol a odvádět je z organismu dříve, než jsou zpracovány. Chitosan je používán jako vláknina zlepšující činnost tlustého střeva, čímž navozuje pocit sytosti, čehož se využívá při redukčních dietách [7].

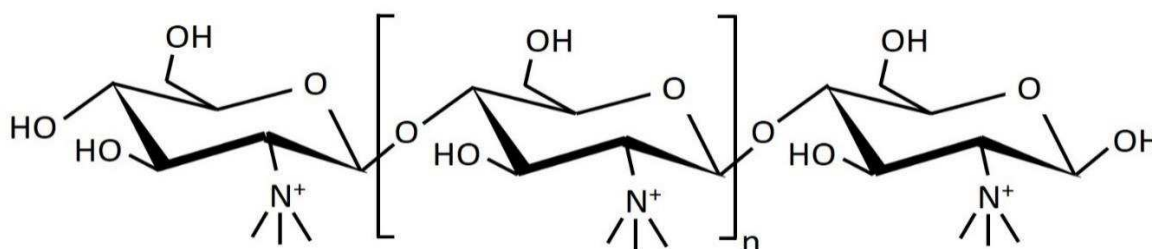
Aplikace chitosanu v **zemědělství** způsobuje odolnost rostlin proti nemocem. Chitosanové přípravky jsou ideální inhibitory růstu houbové, mikrobiální a virové infekce. Díky krycí chitosanové vrstvě na povrchu semen je rostlina schopna nerušeného růstu. Dále se využívá pro přípravu sorbentů, jenž mají vysokou afinitu k těžkým kovům. V oblasti čištění vod má chitosan za následek odstranění a izolaci kovových iontů z odpadních vod díky svému kladnému náboji. Své specifické použití má i jako koagulační či flokulační činidlo pro znečištěné odpadní vody [7].

Taktéž v **potravinářství** se využívá chitosanu, a to při konzervaci potravin. Zde totiž zabraňuje infekci potravin a zpomaluje jejich enzymatický rozklad. Využití najde u přírodních ztužovačů, potravinových aditiv nebo při filtraci a čištění nápojů. Využívá se i v potravinářských procesech, jako je rafinace cukrů. Aplikací roztoku chitosanu na povrch potravin vzniká polorozpustná membrána. Toho se využívá při tvorbě balících papírů na potraviny [7].

Další využití chitosanu nalezneme v biomedicině, kosmetice, agrochemii, fyzikální chemii, konzervaci potravin, čištění vod, impregnaci textilií, vlákna pro textilie a tkaniny, papíry a filmy.

2.2 Trimethylchitosan

Derivát chitosanu s pozitivním nábojem je získán přímou kvarternizací. Jak již bylo dříve zmíněno, chitosan obsahuje tři reaktivní centra. Jedním z center je primární aminoskupina, která snadno podléhá kvarternizaci. Trimethylchitosan může být syntetizován buď kovalentním přidáním substituentu obsahujícího kvarterní amoniovou skupinu, nebo kvarternizací aminoskupin výchozího polymeru. Tímto procesem jsme schopni zvýšit rozpustnost chitosanu ve vodě, ale i podpořit tvorbu komplexů s ionty kovů [9].



Obrázek 3: Struktura trimethylchitosanu

2.2.1 Vlastnosti

Jak již bylo zmíněno, chitosan je velmi omezeně rozpustný ve vodných roztocích s neutrálním a mírně bazickým pH. Vzhledem k jeho unikátním vlastnostem se snažíme o modifikaci, jenž by poskytovala fyziologické využití, čím je právě N, N, N-trimethylchitosan (TMC). Jedná se o derivát s vyšší **rozpustností a bazicitou**. Díky svému permanentnímu kladnému náboji je schopen se rozpouštět při pH až 9. Vyšší rozpustnost je způsobena díky hydrofilním methylovým skupinám na hlavním řetězci vzniklých po syntéze. Nejvyšší rozpustnost trimethylchitosanu z hlediska pH byla dosažena se střední hodnotou stupně kvarternizace (DQ = 40 %) nezávisle na rozdílné deacetylaci a molekulové hmotnosti [10].

Kladný náboj kvarterní amoniové skupiny způsobuje antimikrobiální aktivitu a rozpustnost chitosanu v dolních částech gastrointestinálního traktu za neutrálních nebo alkalických podmínek. V případě nemethylovaného chitosanu se v roztocích neutrálního a alkalického charakteru tyto schopnosti neuplatňují z důvodu absence kladného náboje [10].

Měřitelným parametrem u trimethylchitosanu je **stupeň kvarternizace** značen písmeny DQ (z anglického Degree of Quaternization). Tento zásadní parametr, někdy značen jako hustota náboje, poskytuje informaci o relativním počtu pozitivních nábojů dostupných na molekule pro další interakce. Jednou z možností interakcí jsou negativně nabitě segmenty epitelové membrány, jež mají za následek zvyšující se absorpci léčiv. Využití nalezneme v nosním či rektální absorpci inzulínu pro kterou je ideální DQ = 60 %. Jedná se o důležitý parametr charakterizace, který potvrzuje správnou syntézu připraveného TMC. Nejpřesnější a nejdůležitější metodou, jež DQ dokáže změřit je nukleární magnetická rezonance [11].

Zaváděním substituentů na skupinu aminokyseliny dochází ke snížení **tepelné stability** [11].

2.2.2 Využití

Methylací chitosanu jsme chtěli dosáhnout jeho fyziologického využití. Rozpustností v neutrálním a bazickém pH dosáhneme využití i v medicínských aplikacích. Bohužel pro jiné využití, jako je kosmetika, potravinářství, či životní prostředí, je pro nás výhodnější chitosan nemethylovaný. Není zde nutnost rozpustnosti v bazickém prostředí a zachováme tak mnohá pozitiva pouhého chitosanu, jak je zmíněno v kapitole 2.3.

Chitosan ve své namethylované formě usnadňuje paracelulární **transport hydrofilních léčiv** díky bioadhezi. Díky své netoxicitě a účinnosti je TMC považován za absorpční zesilovač v nosičových systémech. Použitím TMC dostáváme lepší paracelulární permeabilitu peptidových i proteinových léčiv s nízkou rozpustností v lipidech skrz povrchy sliznic. Využívá se tak u sliznic střevní, dýchací a rohovkové epitelové tkáně. Mimo jiné má trimethylchitosan vliv na otevírání těsných spojů mezi buňkami (z anglického Tight junctions). Těsné spoje se nacházejí především ve střevech a jejich rozevřením dochází ke vstřebávání látek. Tento děj je striktně regulovatelný. Hlavní absorpční oblast se nachází v gastrointestinálním traktu [11].

Trimethylchitosan je využíván jako nosič léčiv v různých oblastech tělních aplikací.

- Orální podávání – zůstává výzvou kvůli špatné enzymatické stabilitě v gastrointestinálním traktu a nízké permeabilitě. Způsob podávání ve formě roztoku bylo zamítnuto z toho důvodu, že většina peptidů je nestabilní v přítomnosti vody. Podávání pevné dávkované formy je tedy výhodnější.
- Respirační podávání – při 60% stupni kvarternizace lze předpokládat TMC jako vhodný nosičový systém léčivé látky.
- Kožní podání – superporózní hydrogelové systémy obsahující TMC mohou zvyšovat absorpci léčiva desmopressin přes střevní buňky [11].

Namethylováním chitosanu však nezískáváme jen pozitivní vlastnosti. Úpravou polymeru můžeme některé **z dobrých vlastností chitosanu snížit, nebo případně úplně zničit**. Pro transport léčiv je důležitá i mukoadhezivita, která je u methylovaného chitosanu menší než u nemethylovaného. Je to v závislosti na stupni kvarternizace. Snížení mukoadheze s nárůstem DQ lze vysvětlit změnami konformace příslušných polymerů vlivem interakcí mezi fixními pozitivními náboji na pozici C₂ každého polymeru. Kromě toho mohou sterické účinky způsobené připojenými methylovými skupinami také zakrýt pozitivní náboje na aminoskupinách. Kombinací snížené mukoadhezivity a skrytého pozitivního náboje může docházet ke zpomalení výměny náboje mezi záporně nabitými skupinami hleny a kladně nabitými aminoskupinami u TMC. Výsledkem může být nižší slizová adhezivita [11].

Další z nevýhod vážící se k N, N, N-trimethylchitosanu je jeho obtížná dostupnost a vysoká cena. Je tedy nezbytné tuto látku připravit a nasyntetizovat, což omezuje aplikace TMC.

2.3 Výhody trimethylchitosanu v porovnání s chitosanem

Chitosan po namethylování získává na vylepšení svých vlastností. Není to však pravidlem, protože některé z dobrých vlivů mohou být narušeny nebo dokonce vymizet. Přehled výhod a nevýhod, popřípadě změn po namethylování můžeme sledovat v Tabulka 2

Tabulka 2: Souhrn rozdílů mezi chitosanem a trimethylchitosanem

	Chitosan	Trimethylchitosan
Rozpustnost	pH < 6,0	pH až 9
Vlastnosti	Netoxický, biokompatibilní, biodegradabilní, protinádorový, protizánětlivý, antimikrobiální, antioxidační, terapeutický	
Mukoadhezivita	ano	Ztrácí tuto vlastnost (v závislosti na DQ)
Adsorpční enhancer	Nemá tyto vlastnosti	Adsorpční zesilovač, otevírání tenkých spojů
Nevýhody	Nerozpustnost ve vodě, nedokonalé vlastnosti (toxicita, biodegradabilita, ...)	Cena, obtížná dostupnost, složitá syntéza
Využití	Kosmetika, potravinářství, zemědělství, potravinové doplňky	Farmacie a medicína – nosičové systémy

Uvážíme-li výše zmíněné schopnosti a vlastnosti TMC a vezmeme-li v potaz složitost syntézy, stojíme před rozhodnutím, zda je výhodné trimethylchitosan vyrábět. Doposud nejsou žádné záznamy o širším využití TMC. Hlavním důvodem je nákladnost syntézy, a to nejen materiální, finanční, ale i časová. Methylovaný chitosan je proto součástí mnoha výzkumů a bádání, jež mají za cíl najít to pravé místo pro takto náročnou látku. Nemůžeme ignorovat unikátní vlastnosti, které TMC nabízí. Bylo by pošetilé nepokoušet se alespoň v malém množství o „pochopení“ a začlenění TMC do aplikací, které i přes náročnost syntézy uvítají jeho vlastnosti a schopnosti. Věřím tomu, že trimethylchitosan je pouze nepochopen a své místo brzy najde.

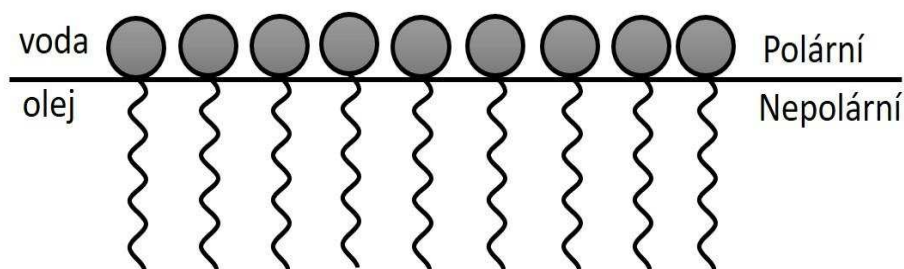
2.4 Tenzidy

V posledních letech se výzkum interakcí nabitých tenzidů s opačně nabitými polymery dramaticky rozrostl. Povrchová a koloidní chemie spadá mezi relativně mladou vědeckou disciplínu, z tohoto důvodu je výzkum v této oblasti v současnosti velice rozvinut. Zvláštní oblast zájmu je soustředována na možnost přenosu léčiv a následného uvolňování. V kombinaci s trimethylchitosanem by se mohlo jednat o bezpečné složky, jenž stabilizují kosmetické přípravky i jako nosiče léčiv s kontrolovaným uvolňováním.

Tenzidy neboli jindy označovány jako povrchově aktivní látky (PAL), jsou takto pojmenovány z důvodu jejich schopnosti hromadit se již při nízké koncentraci na fázovém rozhraní a tím snižovat mezifázovou energii soustavy. Každý systém má snahu přirozeně dosahovat co nejnižší energie, takže snižování energie na fázovém rozhraní je jakousi řídicí silou tohoto procesu [12].

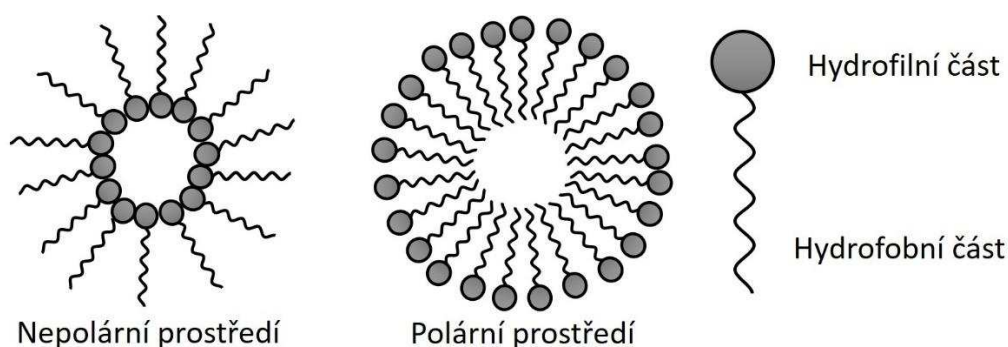
Povrchově aktivní látky jsou organické sloučeniny, které ve své struktuře situované v disperzním prostředí mají polární – hydrofilní a také nepolární – hydrofobní část. Charakteristické jsou i svou lyofilní (v rozpouštědle rozpustnou) a lyofobní (v rozpouštědle nerozpustnou) částí. Jelikož obsahují ve své struktuře obě skupiny, nazývají se látkami amfipatickými neboli amfifilními. Co do velikosti, je polární část (hlavička) menší, je tvořena hydrofilními funkčními skupinami (např. $-\text{COOH}$). Naopak nepolární část je tvořena dlouhým uhlovodíkovým řetězcem (ocásek) [12].

Z těchto protichůdných sil v jedné molekule vyplývají dva jevy: adsorpce a agregace. Pokud se bude povrchově aktivní molekula nacházet na rozhraní olej/voda, molekuly se budou orientovat takovým způsobem, aby co nejvíce minimalizovaly kontakt mezi svou hydrofobní skupinou a vodou. Tento proces je označován jako **adsorpce** a má za následek změnu vlastností na mezifázovém rozhraní [12].



Obrázek 4: Adsorpce tenzidů na povrchu přechodu vody – oleje

Podobně tomu je u způsobu omezování kontaktu mezi hydrofobními skupinami a vodou při tzv. **agregaci**. Polární hlavičky molekuly jsou orientovány na vodní fázi a chrání tak nepolární části, které se skryjí uprostřed shluku molekul. Tyto agregáty povrchově aktivních látek se tvarově liší v závislosti na koncentraci – jsou známy kulovité, válcovité ale i lamelární [12] [13].

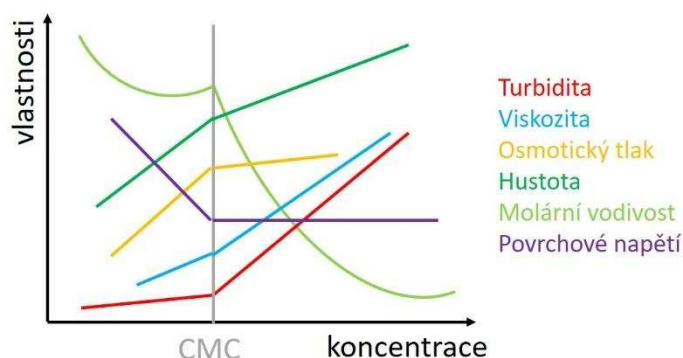


Obrázek 5: Způsob agregace v micelu v závislosti na prostředí

Při vyšší koncentraci dochází k agregaci – tzv. **micelizaci**. Tento proces je zapříčiněn amfipatickým neboli amfifilním charakterem molekul. Každá povrchově aktivní látka tedy má jak část lyofilní (rozpustnou v daném prostředí), tak i lyofobní (nerozpustnou v daném prostředí) a neochota ke kontaktu s rozpouštědlem je natolik veliká, že dochází k agregaci v micelu. V závislosti na koncentraci tenzidu, teplotě, pH a iontové síle roztoku bude mít micela tvar válce, hexagonálního kapalného krystalu či jiný. Záleží čistě na prostředí, ve kterém se tenzidy nacházejí. Pokud se jedná o roztok polární, na okraji micely budou hydrofilní části tenzidu a jedná se o klasickou micelu. V případě opačném, tedy nepolárním prostředí, je jádro tvořeno hydrofilní skupinou, zatímco uhlíkové konce směřují do roztoku, jak je vyobrazeno na Obrázku 5 a mluvíme o micelle reverzní [13].

Postupným zvyšováním koncentrace se tenzidy, chovající se jako pravé roztoky, stávají volnými molekulami v roztoku, které se následně začínají shromažďovat na mezifázovém rozhraní, kde snižují povrchové napětí. Avšak stálým zvyšováním koncentrace dochází k nasycení mezifázového rozhraní a roztok dosáhne kritické micelární koncentrace (CMC) [13].

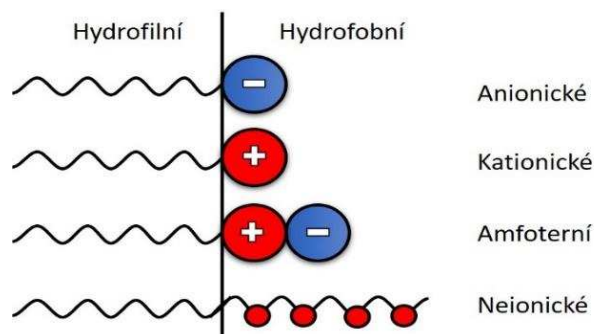
Kritická micelární koncentrace (CMC) je bod, kdy se v roztoku začnou vytvářet micely neboli udává taky nejvyšší možnou koncentraci, při které je tenzid v roztoku v molekulové nebo iontové formě. Přidáme-li do tenzidového roztoku polymer, může docházet již při nižší koncentraci k agregaci. Po dosažení CMC se změní mnoho fyzikálně-chemických vlastností roztoku, protože dochází ke vzniku micel. Jmenovitě se jedná o změnu molární vodivosti, elektrické vodivosti, osmotického tlaku a povrchového napětí [13].



Obrázek 6: Závislost změny fyzikálně-chemických vlastností při dosažení CMC

2.4.1 Rozdělení tenzidů

Hydrofilní část povrchově aktivní látky může mít negativní, pozitivní náboj vůbec žádný náboj. Poté jsou klasifikovány jako aniontové, kationtové, amfoterní nebo neiontové povrchově aktivní látky. Rozdělení tenzidů pak probíhá na základě jejich schopnosti disociovat ve vodném prostředí, jak je uvedeno níže:

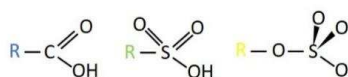


Obrázek 7: Klasifikace tenzidů

Ionické

Charakteristikou pro tuto skupinu je tvorba iontů po rozpuštění ve vodě. Ty se tvoří oddálením částí původních částí molekuly v místě iontové vazby. Kolem každého místa, ve kterém je lokalizován náboj se díky vodě vytvoří solvatační obal.

Anionické – Tato skupina obsahuje tenzidy, které jsou základem detergentů užívaných u práškových i kapalných pracích prostředků, mýdel a dalších. Jedná se o průmyslově častou používanou skupinu. Patří mezi ně dodecylsulfát sodný (SDS). Hlavní funkční skupiny jsou:



Obrázek 8: Příklady funkčních skupin

Kationické – Zde řadíme sloučeniny s jednou nebo více kladně nabitými funkčními skupinami. Využívají se jako avivážní prostředky, vlasová kosmetika, desinfekční a antiseptické látky, jež mají mimo jiné i mikrobicidní efekt. Obsahují kvartérní dusíkový atom nesoucí kladný náboj – jedná se tedy o kvartérní amoniové soli, a to chloridy nebo methosulfáty. Klasickým příkladem této skupiny je triethylhexadecylamoniumbromid.

Amfoterní – Ve své struktuře obsahují anion tak kation, což umožňuje kombinaci s kationickými i s anionickými tenzidy. V závislosti na pH se poté chovají jako aniontové v alkalickém prostředí a v kyselém jako kationtové tenzidy. Nalezneme je v šampónech, tekutých mýdlech či v koupelových pěnách. Mezi tuto skupinu řadíme lecithin.

Neionické

Tyto tenzidy se ve vodném roztoku nedisociují a nevytváří tak ionty. Struktura tenzidu proto musí obsahovat hydrofobní části, aby byla sloučenina schopná se ve vodě rozpustit. V textilním průmyslu jsou neionické tenzidy využívány jako lubrikant a antistatický a apretační prostředek a je jím právě dodecylether tetraethylenglykol [14].

3 CÍL PRÁCE

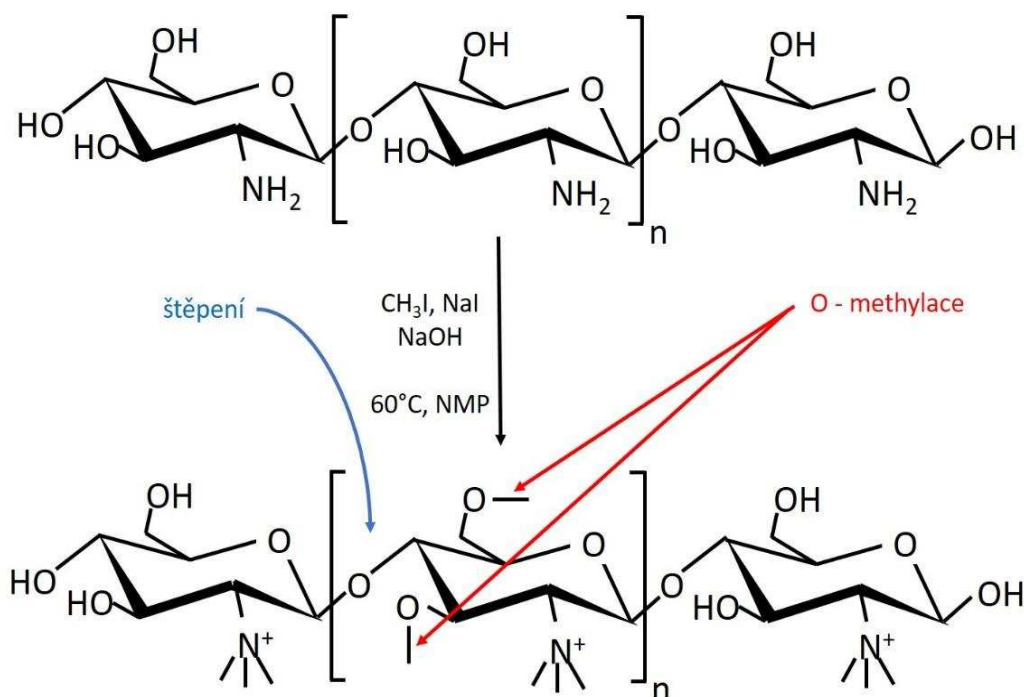
Hlavní cíle této bakalářské práce jsou shrnuty v následujících bodech:

- Nastudovat současný stav řešené problematiky a na základě toho vypracovat literární rešerši na téma přípravy trimethylchitosanu a jeho schopnosti interakce.
- Navrhnout postupy vhodné pro přípravu trimethylchitosanu a následně provést syntézu trimethylchitosanu.
- Provést základní charakterizaci trimethylchitosanu pomocí vhodných fyzikálně-chemických metod.
- Experimentálně ověřit možnosti interakce trimethylchitosanu s variabilně nabitými sloučeninami.
- Diskutovat výsledky a vyvozovat logické závěry.

4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

4.1 Příprava methylovaného chitosanu

Kvarternizace neboli metylace aminoskupin v chitosanu může být dosažena v přítomnosti methyljodidu za podmínek zvýšené teploty (60 °C) a silného zásaditého prostředí (aby nedocházelo k protonizaci nezreagovaných aminoskupin), což vede k navázání kyseliny, která vzniká během reakce a díky tomuto kroku nedochází k protonaci nezreagovaných primárních aminokyselin [10].



Obrázek 9: Syntéza trimethylchitosanu z chitosanu

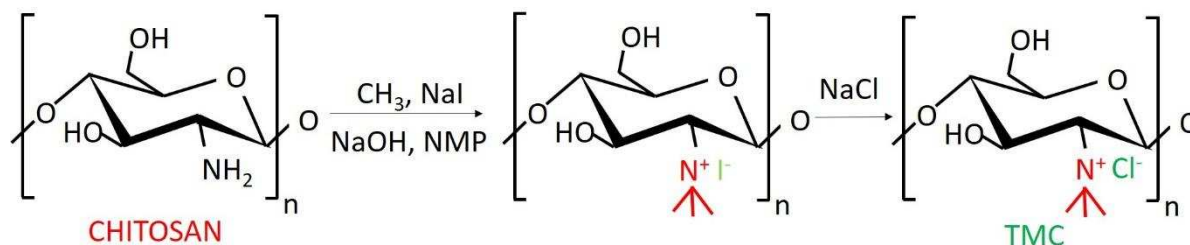
Bylo vydáno velké množství různých odborných publikací zahrnujících postupy, jak správně nasyntetizovat trimethylchitosan. Mnohé z nich jsou si velice podobné a většina z nich vychází a odkazuje se na syntézu provedenou v roce 1998 A.B. Sievalem a jeho skupinou. Další a novější články mají základ právě v této studii a doplňují syntézu o novodobá zjištění a vylepšení [15].

Základy syntézy položili **Domard a spol.**, jež jako první popsali syntézu N,N,N-trimethylchitosanu. Na základě disperze 5 g chitosanu v 250 ml N-methyl-2-pyrrolidonu reagujícím s CH₃I a NaOH (chitosanu: CH₃I: NaOH v molárním poměru 1:15:2) po dobu 3 hodin při 36 °C. Nebyli však úspěšní, protože tato metoda způsobila extenzivní depolymeraci chitosanu díky teplotě. Tento postup byl inovován na jiné poměry reaktantů (chitosanu: CH₃I: NaOH v molárním poměru 1:15:3,45). To vedlo ke snížení polymerní degradace a kontrole různých parametrů ovlivňujících kvarternizaci. Výsledkem však byl 10–15% dimethylovaný polymer, což je pro naše účely nedostačující. Cílem naší syntézy je trimethylovaný polymer ve formě trimethylchitosanu [16].

Právě již zmiňovaní **Sieval a spol.** provedli syntézu, která změnila postup a pořadí v přidávání rozpouštědel a reagentů. V jejich práci nalezneme jednokrokovou a dvou krokovou syntézu. Byly použity částice menší než 500 μm . Při jednokrokové syntéze byl chitosan dispergován v N-methyl-2-pyrrolidonu (dále NMP) s CH_3I a NaI při konstantní teplotě (60 $^\circ\text{C}$) a dále byl přidán NaOH , čímž došlo ke vzniku soli a zabraňuje protonizaci aminokyselinových skupin. Následoval druhý krok syntézy, kdy byl chitosan dispergován ve vodném roztoku NaOH s NaI a poté byl přidán CH_3I smíchaný s NMP. Produkt byl vysrážen přídavkem ethanolu a izolován centrifugací (viz *Obrázek 9*). Dimethylace se signifikantně snížila při opakování základních reakcí. Výsledky jsou velice příznivé a efektivní k vzhledem k přípravě. To jsou důvody proč mnohé články vycházejí z tohoto postupu [15].

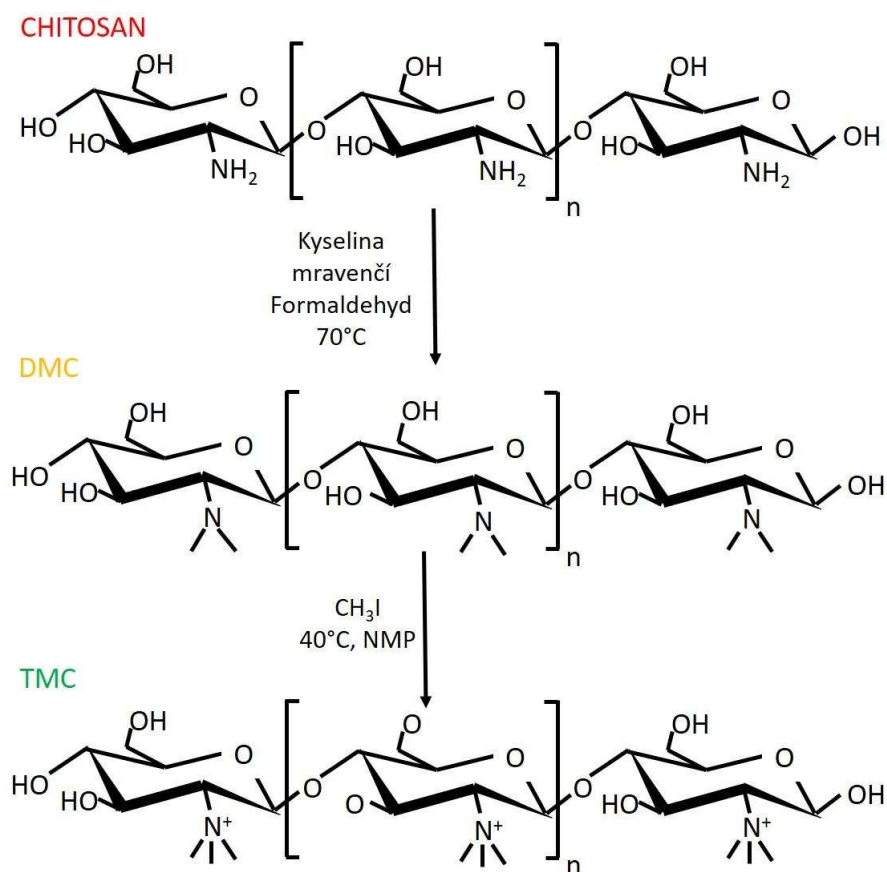
V rešerši vydané v roce 1999 **Thanouem a spol.** zabývající se N,N,N-trimethylchitosanem postupují dle postupu Sievala s malou výjimkou, kdy na konci druhého kroku je opět výrobek vysrážen přidáním ethanolu a izolován odstředěním, pak však následuje krok čištění konečného produktu, který zahrnuje výměnu protiiontu jodidu s chloridem v roztoku chloridu sodného a prodlužuje se tak promývání ethanolem a diethyleterem (viz *Obrázek 10*). Kombinací ethanolu a diethyleteru 1:1 dochází k zastavení reakce. Následuje obdobný postup sušení ve vakuu a následná charakterizace. Výměna jodidového iontu s chloridovým byla provedena rozpuštěním kvarternizovaného polymeru v malém objemu vody doprovázené přidáním HCl v methanolu nebo rozpuštěním v roztoku NaCl . Výměna může být také dosažena dialýzou (místo roztoku NaCl a vodě) [17].

Článek studuje přenos hydrofilních makromolekulárních léčiv, které s použitím propidium jodidu jsou nepropustné pro membránu. Čištěním N,N,N-trimethylchitosanu chloridem se tomuto vyvarují [18].



Obrázek 10: Záměna jodidu za chlorid

Ve článku vydaném autory **Rolfem J. Verheultem a spol.** je uvedena syntéza jiná, lišící se od předcházejících a jako jediná nevychází ze Sievala. Prvním krokem této syntézy je převedení chitosanu na dimethylchitosan (dále DMC) za pomoci reakce Eschweiler-Clarke s formaldehydem a kyselinou mravenčí. Tímto stupněm bylo dosaženo 93% methylace. Dále byl polymer rozpuštěn v NMP a převeden na TMC za použití nadbytečného množství jodmethanu (viz *Obrázek 11*). Stupeň kvarternizace je ovlivňován dobou reakčního času (pozitivnější ohlas nalezneme u reakce delší) při udržování stálé reakční teploty 60 $^\circ\text{C}$ a konstantního poměru $\text{DMC}/\text{CH}_3\text{I}$. Tato syntéza je výhodná v tom, že zabraňuje nadbytečné O-methylaci, která vede k méně rozpustným produktům [19].



Obrázek 11: Dvoustupňová syntetická dráha pro přípravu TMC zabráňující O-methylaci

Podobná strategie byla popsána v rešerši **Muzzarelliho a Tanfaniho**, kde opět využívají reakce s formaldehydem za pomoci Schiffovy báze (vznik iminu jehož R₃ je alkylovou nebo arylovou skupinou), avšak poté následuje redukce borohydrátem sodným a kvarternizací v alkalickém prostředí methyljodidem. Tato dvoukroková metoda pravděpodobně zabráňuje štěpení řetězce a deacetylaci zbývajících N-acetylových skupin což vede k tvorbě TMC bez O-methylace [20].

Všechny výše uvedené metody využívají methyljodid, který (i přes svou vysokou efektivnost) je vysoce těkavý, karcinogenní a drahý. Navíc nabízí omezenou kontrolu nad nebezpečnou chemickou reakcí.

Alternativní pořadí pro syntézu chitosanových derivátů navrhl **Britto a spol.** Jako reaktant použili dimethylsulfát, přičemž polymer v roztoku NaOH a NaCl byl smíchán a refluxován s methylačním činidlem při pokojové teplotě nebo 70 °C [9].

Po prozkoumání všech aspektů a porovnání jednotlivých pozitiv a negativ u studovaných syntéz jsme se rozhodli pro syntézu dle Sievala a spol. Jedná se o osvědčený postup, jež je několikanásobně citován a výsledkem nám bude trimethylchitosan s 80% stupněm kvarternizace, jež je pro nás žádoucí pro další využití v dýchacím aparátu.

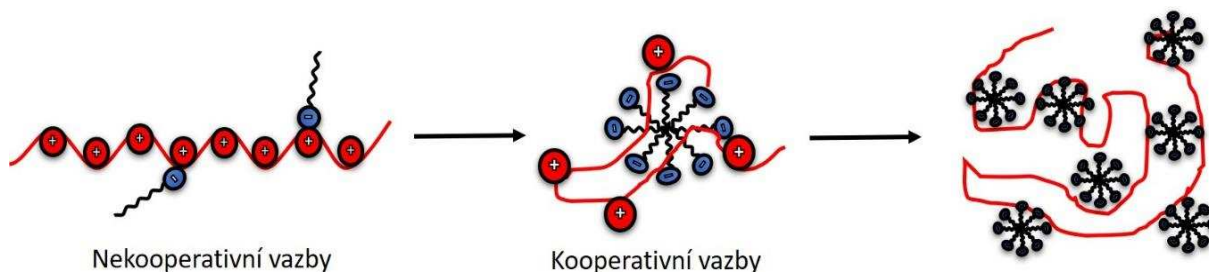
4.2 Interakce TMC s opačně nabitými látkami pro biomedicínské aplikace

Studium interakcí N,N,N-trimethylchitosanu ukazuje, že se jedná o kladně nabitý polyelektrolyt, který je schopný interagovat s opačně nabitými látkami. Této skutečnosti se využívá při podávání léčiv. TMC má navíc excelentní fyzikálně-chemické vlastnosti, které přímo nabízí aplikaci do organismu [13].

K interakcím může docházet i s **tenzidy** za vzniku vazeb fyzikálního původu díky elektrostatickým interakcím. Právě tyto elektrostatické interakce zachovávají biokompatibilitu a biodegradabilitu produktu. Elektrostatické síly jsou způsobeny interakcí opačných nábojů obou komponent. V případě tenzidů však nesmíme zanedbat interakce hydrofobní, které se vyskytují u polymerů s hydrofobní částí nebo skupinou [21].

Následkem čistých elektrostatických interakcí mezi kationtem polyelektrolytu a tenzidovým aniontem bývá zadržování tenzidů okolo kationtu polyelektrolytu nepolárními částmi. Tenzid podléhá agregačnímu procesu, pokud je koncentrace tenzidu o několik řádů nižší než kritická micelární koncentrace v čistém rozpouštědle. Těmto agregátům pro svou velikost říkáme „minimicely“. Distribuce však není podél řetězce rovnoměrná, ale lokalizovaná ve formě agregátů. Micely jsou vázány kooperativně na rozdíl od protiiontů, které jsou vázány nekooperativně. Tenzid se však díky svým nepolárním zakončením snaží minimalizovat kontakt s vodou, a tak se agregáty na polykationtu stáčí do řetězce [21].

Při takovýchto reakcích dochází k jevu, který nazýváme „perlový náhrdelník“ (viz *Obrázek 12*). Dochází zde totiž ke vzniku micel indukovaných polyelektrolytem a ty se vážou na řetězec polyelektrolytu na polyiontech.



Obrázek 12: Struktura perlového náhrdelníku

TMC tvoří nanočástice s různými aniontovými polyelektrolyty. Je zřejmé, že nanočástice TMC jsou ústředním prvkem v oblasti poskytování léků právě díky svým fyzikálně-chemickým vlastnostem. Následující články se zabývají interakcemi kladně nabitého TMC se záporně nabitou látkou a následně interakcí s lékovými formami.

V článku vydaném autory **J. Young a spol.** je popsána příprava nanočástic z TMC a *chondroitin sulfátu*. Chondroitin sulfát je důležitou pojivovou složkou tkáně a chrupavky se schopností vázat se na jádra proteinů. Autoři nejenže dokázali nanočástici připravit, ale také dokázali její absorpci v buňkách fagocytózou. Tento nový systém vykazoval vynikající kapacitu pro zachycení a následné kontinuální uvolňování proteinu, což považujeme za přesvědčivé rysy pro podávání *genů, antigenů a proteinů* různými cestami [22].

S *tripolyfosfátem sodným* (STP – sodium tri-polyphosphate) pracovali **R. Paliwal a spol.** Cílem této studie bylo zjistit potenciál nanočásticových systémů TMC – STP pro perorální biologickou dostupnost *nízkomolekulárního heparinu* (LMWH). Výzkumem byl tento cíl potvrzen, a tak nanočástice TMC mohou být v budoucnu využity pro orální podání LMWH a klinickou použitelnost pro léčbu cévních poruch jako je hluboká žilní trombóza a plicní embolie [23].

Autoři **A. F. Martins a spol.** dokázali charakterizaci komplexů TMC a *alginátu*, že se jedná o užitečný základ pro podávání léčiv. Alginát sodný je biopolymer používaný jako nosič pro dodávku různých proteinových léků kvůli jeho biologicky rozložitelným a biokompatibilním vlastnostem a také vynikajícím vlastnostem pro udržení bioaktivity proteinů. Kromě toho se alginát používá jako gel pro jeho protizánětlivé, antacidové a komplexní ochrany vůči ráně [24].

V roce 2012 **Y. Jin a spol.** potvrdili účinnost *inzulínových* TMC nanočástic s modifikovaným peptidem při perorálním podání. Došlo ke snížení cytotoxicity, což může být připisováno stínění pozitivních nábojů na TMC negativními náboji peptidu. Ve výsledku modifikované peptidy TMC měly lepší hypoglykemický účinek s 1,5–krát vyšší relativní biologickou dostupností ve srovnání s nemodifikovanými nanočásticemi [25].

Mansur, Mansur, Curti a De Almeida uvádějí, že TMC může být využit jako ligand pro výrobu koloidních *kvantových teček*. Kvantové tečky jsou jedním z nejzajímavějších materiálů v oblasti nanovědy a nanobiotechnologie díky jejich malé velikosti a luminiscenčním vlastnostem. Nový biologický funkční systém by mohl být potenciálně použit jako biosorbent a fluorescenční biomarker při včasné diagnostice [26].

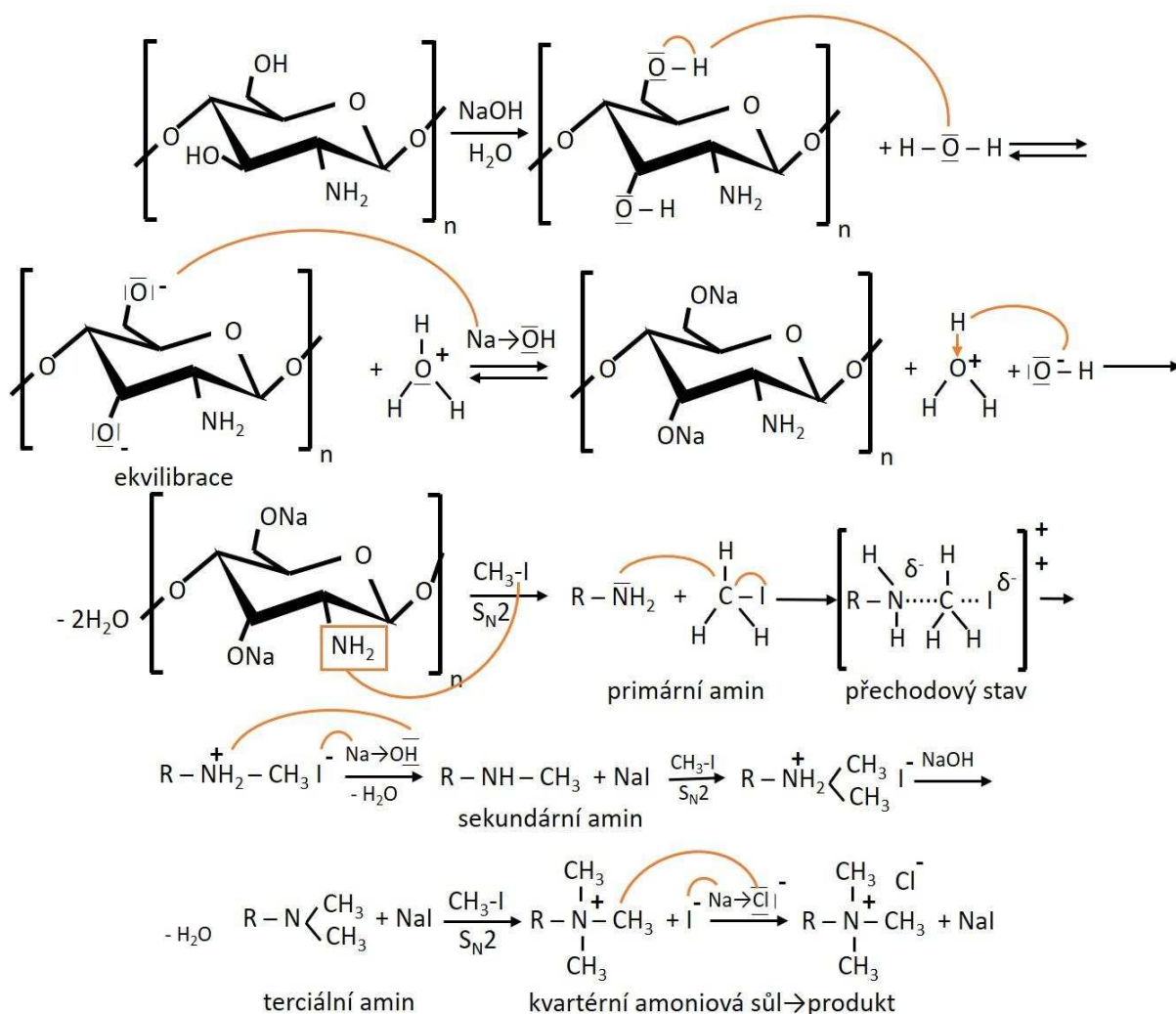
Všechny tyto aplikace spadají pod širokou škálu uplatnění TMC v praxi. Jmenovitě se jedná o systém dodávání léků, tkáňové inženýrství, přenos genů, diagnostické aplikace, dodávání vakcín a lékových forem, využití jako elektrostatický stabilizátor, přenos proteinů nebo pro zvýšení absorpčních vlastností.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Použité chemikálie

	vzorec	Mr	CAS	dodavatel	šarže
Chitosan		250 KDa	9012-76-4	Sigma Aldrich	448877-2506
		168 KDa	9012-76-4	Sigma Aldrich	448869-2506
Hydroxid sodný	NaOH	40,00	1310-73-2	Lach-Ner, s.r.o.	PP/2013/06111
Chlorid sodný	NaCl	58,44	7647-14-5	Lach-Ner, s.r.o.	PP/2011/02639
Jodid sodný	NaI	149,89	231-679-3	Lach-Ner, s.r.o.	311400804
Ethanol	C ₂ H ₆ O	46,08	64-17-5	Penta s.r.o.	1904150416
Iodomethan	CH ₃ I	141,94	74-88-4	Sigma Aldrich	67692
Diethyl ether	C ₄ H ₁₀ O	74,12	60-29-7	Lach-Ner, s.r.o.	PP/2010/06958
Aceton	C ₃ H ₆ O	58,08	67-64-1	Lach-Ner, s.r.o.	PP/2013/00914
1-methyl-2-pyrolidinon	C ₅ H ₉ NO	99,13	872-50-4	Sigma Aldrich	606-021-00-7
Alginát sodný			9005-38-3	Sigma Aldrich	180947-5006
Agaróza			9012-36-6	Sigma Aldrich	A9539-100G
Dodecyl síran sodný	C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S		151-21-3	Sigma Aldrich	L3771-1006
Rhodamin	C ₂₈ H ₃₁ N ₂ O ₃ Cl		989-38-8	Sigma Aldrich	R4127-25G
Chicago sky blue 6B	C ₃₄ H ₂₄ N ₆ Na ₄ O ₁₆ S ₄		222-3	Sigma Aldrich	20,138-3
Methylenová modř	C ₁₆ H ₁₈ ClN ₃ S		122965-43-9	Sigma Aldrich	M9140
Amidočern	C ₂₂ H ₁₄ N ₆ Na ₂ O ₉ S ₂				

5.2 Průběh syntézy TMC



Obrázek 13: Průběh syntézy dle Sievala

Syntéza TMC byla provedena dle reference Sievala [15] s mírnou úpravou a doplněním chybějících informací ze zdroje [17]. V hlavním článku nebyly uvedeny časové možnosti a v závěru syntézy došlo k doplnění kroku čištění, jenž Sieval nepopisuje. Další změnou byla záměna srážecího činidla z ethanolu na aceton, jak to popisuje reference [27] z důvodu vzniku lepších struktur a vzhledu produktů. Všechny tyto změny se promítly na výsledném produktu a na progresu syntézy, jak ukazuje *Obrázek 22* v kapitole 6.1.

Následující postup byl vyvinut za účelem vytvoření TMC s 60% stupněm kvarternizace a z tohoto důvodu byla provedena dvoustupňová kvarternizace.

Po sestavení nezbytné aparatury byly připraveny navážky a namíchány potřebné roztoky 10 hm.% NaCl a 15 hm.% NaOH. Byl použit chitosan se stupněm deacetylce 75–85 % a s velikostí částic menší než 200 μm , čehož bylo docíleno rozdrčením v třecí misce a následným prosetím sítý o určené velikosti. Pečlivou separací částic bylo dosaženo snadnějšího rozpouštění. 2 g rozdrčených částic byly smíchány s 80 ml organického rozpouštědla 1-methyl-2-pyrrolidinonu (dále NMP) a směs byla podrobena rozpadu v sonifikátoru po dobu 4 minut a při laboratorní teplotě. K takto připravené směsi bylo přidáno

4,8 g NaI, jenž napomáhá rozpustnosti a vše bylo zahříváno ve vodní lázni do dosažení 60 °C za stálého míchání na magnetické míchačce (300 ot/min). Při 60 °C, i když chitosan stále nebyl rozpuštěn, bylo přidáno 11 ml 15% NaOH za vzniku soli, jenž vede k lepší rozpustnosti, dále 11,5 ml CH₃I, který figuruje jako methylační činidlo. Směs byla zahřívána na 60 °C po dobu 60 minut za stálého míchání. Pevný podíl byl od supernatanu oddělen přidavkem 250 ml acetonu a centrifugací 4,500 x g 15 minut. Na závěr první fáze byl produkt dvakrát promyt diethyletherem na nuči s fritou pro odstranění acetonu.

Následoval druhý krok syntézy, kdy byl chitosan rozdělen na více částí a 40 minut rozpouštěn v 80 ml NMP a zahříván na 60 °C, díky čemuž byl odstraněn naadsorbovaný ether. Bílý produkt se zabarvil do hněda a stal se nerozpustným. Následně do rychle míchaného roztoku (300 RPM) bylo přidáno 4,8g NaI, 11 ml 15 % NaOH a 7 ml CH₃I a směs byla zahřívána na 60 °C po dobu 90 minut. Došlo k odbarvení pevného oddílu do bezbarvého (neopalescentního) roztoku a neúplnému rozpuštění. Tyto části byly odděleny před zahájením dalšího kroku. Roztok byl vysrážen 300 ml acetonu a finální produkt ve formě bílého prášku byl centrifugován (4,500 x g 15 minut). Tento produkt byl rozdělen na dvě stejné části a rozpouštěn v 20 ml a 25 ml 10 % NaCl pro iontovou výměnu jodidu za chlorid. Tento krok byl prováděn max. 90 minut na automatické míchačce při 300 RPM. Po této době byly vyloučeny zbylé nažloutlé kousky slizovité hmoty. Polymer byl opět vysrážen acetonem, složky byly separovány následnou centrifugací a promyty dvakrát etherem na skleněném filtru. Závěrem byl produkt sušen ve vakuové sušárně 48 hodin při tlaku 70 mbar a teplotě 40 °C (což je nad teplotou varu etheru) a výsledkem byl bílý, ve vodě rozpustný prášek.

Bylo nasyntetizováno 5,323 g TMC. Výtěžky s rozdílem objemu NaCl se mírně lišily vzhledem. Rozpouštění ve větším objemu NaCl mělo vzhled hrudkovité směsi a výtěžek 2,846 g, zatímco s menším objemem je TMC jevil jako prášek s občasnými hrudkami a vážil 2,477 g.



Obrázek 14: Výtěžky TMC o rozdílné struktuře

5.3 Charakterizace připraveného trimethylchitosanu

Po úspěšné syntéze je nastávajícím krokem charakterizace, která je nezbytná pro ověření správného průběhu syntézy, kdy v našem případě očekáváme produkt N,N,N-trimethylchitosan. Tento nezbytný krok nám dodává informace, zda je produkt opravdu methylovaný a také, zda byly methylovány správné funkční skupiny, u kterých to očekáváme ($-\text{NH}_3$).

Pomocí následujících metod jsme schopni stanovit stupeň methylace, rozpustnost a základní fyzikálně-chemické vlastnosti (stupeň kvarternizace, molekulovou hmotnost, elementární složení, ...).

5.3.1 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

Tato metoda napomáhá identifikovat funkční skupiny obsažené ve struktuře zkoumané sloučeniny pomocí interakce infračerveného záření se vzorkem, kde dochází ke změnám rotačně vibračních energetických stavů molekuly v závislosti na změnách dipólového momentu molekuly. Z výsledných hodnot vibračních energií získáváme informaci o pevnosti chemických vazeb, molekulové geometrii a hmotnosti jader, tedy o celé molekulové struktuře [28].

Měření bylo provedeno na přístroji Nicolet iS50 (Thermo Scientific) a byla stanovena přítomnost methylových skupin ve struktuře nově vzniklého TMC. Pro měření byla použita metoda ATR krystal (Attenuated Total Reflectance), kdy na krystal byl nanesen vzorek a byl měřen vnitřní odraz. Vše se odehrálo v rozsahu měření $4\,000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ a bylo provedeno 64 skenů při rozlišení 2 cm^{-1} .

5.3.2 Elementární analýza

Velice užitečná je v našem případě prvková analýza, která dokazuje přítomnost jednotlivých prvků, kterými jsou uhlík, vodík, dusík, kyslík a síra. Předpokladem dalších postupů je mineralizace organického vzorku, a to oxidační nebo redukční cestou rozkladu. Následovně použijeme anorganické analýzy stanovení vzorku.

Elementární analýza je důležitou charakterizací, která je schopná dát informaci o stavu zastoupení jednotlivých elementů ve vzorku, konkrétně se jedná o CHNOS. Tato skutečnost je nám velice užitečná, protože při porovnávání chitosanu a TMC můžeme vidět rozdíl v namethylované skupině, která sloučenině přidává procentuální zastoupení vodíku a uhlíku díky skupině CH_3 - [28].

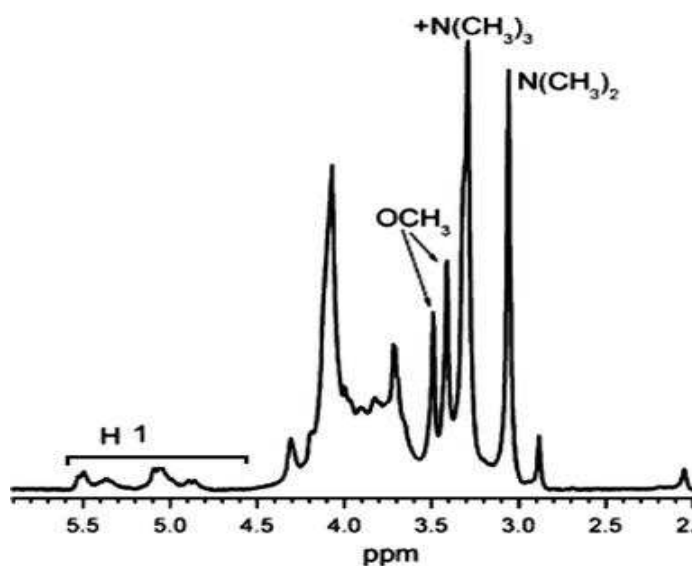
Měření bylo realizováno na prvkovém analyzátoru CHNS/O, jenž náleží společnosti EuroVector & Instruments.

5.3.3 Nukleární magnetická rezonance

Nukleární magnetická rezonance (NMR) patří mezi analytické metody a slouží k stanovení analyzovaných látek jak kvantitativní, tak kvalitativní cestou. Proto této metody můžeme využít k ověřování finální struktury připravovaného TMC, ale také ke stanovení stupně kvarternizace (DQ). NMR se využívá nejčastěji pro stanovení syntetizovaných organických struktur [29].

Atomová jádra některých prvků mají magnetický moment a ve vnějším magnetickém poli se orientují do poloh, kterým odpovídají určité energetické hladiny. Absorpcí elektromagnetického záření v oblasti krátkých rádiových vln dochází k přechodu jádra na vyšší energetické hladiny. Nenulový magnetický moment m mají pouze jádra s nenulovým celkovým jaderným spinem I . Jeho hodnota souvisí s počtem protonů a neutronů v jádře. Uhlík a kyslík mají jádra nemagnetická, což zjednodušuje spektra organických látek. Největší význam má vodík, jehož jaderné spinové číslo $I = 1/2$. Z kvantové mechaniky vyplývá, že jádro vodíku bude mít 2 možné orientace. Rozdíl stavů energií jádra roste s magnetickou indukcí vnějšího magnetického pole [29].

Při samotném měření jsou dvě možnosti: buď působí na vzorek vysokofrekvenční elektromagnetické pole stálé frekvence a mění se hodnota magnetické indukce, nebo je magnetická indukce konstantní a mění se frekvence elektromagnetického pole. Při tom se zkoumá, kdy nastává rezonance. Rezonanční frekvence není u všech protonů shodná. Je ovlivněna nejbližším okolím sledovaného protonu v molekule. Tímto okolím je myšleno vnější magnetické pole blízkých jader v molekule nenulového magnetického momentu [28].



Obrázek 15: NMR spektrum trimethylchitosanu [10]

NMR spektra byla měřena v deuterovaných rozpouštědlech a v kyvetách z pyrexového skla při teplotě 30 °C. Standard TMS byl měřen na přístroji Bruker Avance 500 s pracovními frekvencemi 500,13 MHz (^1H). Chemické posuny byly vyjádřeny v ppm a byly standardizovány signálem odpovídajícím deuterovaným rozpouštědlům (D_2O 4,79 ppm). Interakční konstanty (J) jsou vyjádřeny v Hz.

5.4 Příprava hydrogelů na bázi TMC

Pro vznik hydrogelů z kladně nabitého trimethylchitosanu (TMC) byly jako záporně nabitě protějšky vybrány alginát (ALG) a dodecylsulfát sodný (SDS) s koncentracemi uvedenými níže u konkrétních příkladů. Vypočítané množství pro cílovou koncentraci bylo naváženo do osmi centrifugačních zkumavek. Pro každou kombinaci roztoků bylo připraveno stejné množství do dvou z centrifugačních zkumavek a byly tak vytvořeny dva stejné roztoky pro potvrzení správnosti měření.

Pro TMC bylo naváženo 0,2 g a kvantitativně převedeno do 20 ml destilované vody a tento 1 hm% roztok byl míchán při 300 RPM po dobu 6 dní do úplného rozpuštění při laboratorní teplotě. Dlouhý časový interval míchání zajistil

Pro roztoky ALG byly zvoleny dvě rozdílné koncentrace, a to 10 g/l a 5 g/l. Pro vyšší koncentraci bylo rozpuštěno 0,5 g ALG v 50 ml destilované vody a při nižší koncentraci se jednalo o 0,25 g ve stejném objemu. Míchání roztoků při 300 RPM trvalo taktéž 6 dní do úplného rozpuštění. Po rozpuštění byly roztoky odváženy v poměru 1:1 TMC a ALG s vyšší koncentrací a 1:3 TMC a ALG s nižší koncentrací.

Zásobní roztoky pro SDS o koncentracích 0,2 M a 0,05 M byly připraveny rozpuštěním 5,7674 g a 1,4419 g v 10 ml destilované vody. Stejně jako předchozí roztoky byly míchány na magnetické míchačce při 300 RPM po dobu jednoho dne do úplného rozpuštění. V obou případech bylo naváženo 2,5 g TMC a 2,5 g SDS o různých koncentracích.

Po smíchání jednotlivých komponent došlo k zakalení výsledného roztoku a po 2 dnech třepání na třepačce byly centrifugační zkumavky uloženy na tmavé místo při laboratorní teplotě bez vnějších vlivů. Po dobu 2 dní probíhala sedimentace a vyloučení gelu na dně zkumavky. Těsně před měřením byly všechny centrifugační zkumavky odstředěny v rotační centrifuze po dobu 10 minut při 4000 ot/min. a byl odlit vyloučený supernatan.



Obrázek 16: Hydrogely před závěrečnou centrifugací

5.5 Charakterizace hydrogelů pomocí oscilačních testů

Pro studium viskoelastických vlastností připravených hydrogelů byla vybrána reologická měření na reometru typu AR-G2 od společnosti TA Instruments. Kvůli malému množství vzorku a jeho charakteru byla vybrána geometrie deska-deska s průměrem horního senzoru 8 mm. Veškerá měření byla realizována při 25 °C, což bylo zjištěno temperací Peltierovy desky. Zvolená geometrie disponovala zdrsňelým povrchem, jenž zabraňoval prokluzování vzorku v průběhu měření. Vzdálenost horní pohyblivé desky v měřicí poloze od spodní stacionární desky byla stanovena na 200 μm opět s ohledem na množství vzorku.

Mechanické vlastnosti každého hydrogelu byly zkoumány pomocí dvou testů. Pomocí amplitudového testu s konstantní frekvencí oscilací (z angl. strain sweep) byla stanovena tzv. *lineární viskoelastická oblast* (LVO), díky které pak byla vybrána hodnota konstantní amplitudy deformace pro druhý test tak, aby nedošlo k neelastickému zdeformování vzorku při stanovení viskoelastických charakteristik pomocí frekvenčního testu. Po překročení této hodnoty nastává nevratné porušení uzlů gelu a struktura gelu není schopna se vrátit do původního stavu (zrelaxovat). Nastavení amplitudového testu bylo následující: normálová síla 10 N byla nastavena v průběhu stlačování vzorku, když senzor zaujal pozici měřicí polohy a dále při teplotě 25 °C byl vzorek temperován po dobu 5 minut. Frekvence oscilací byla nastavena na hodnotu 1 Hz a tato hodnota byla udržována konstantní v průběhu celého amplitudového testu. Amplituda deformace se pohybovala v rozmezí od 0,001 % do 100 %, a to pro veškerá měření. Na vzorek byla amplituda deformace aplikována ve vzrůstajícím režimu v logaritmickém módu s počtem 6 bodů na dekádu.

Následoval již zmiňovaný frekvenční test s konstantní amplitudou deformace (z angl. frequency sweep) a také s konstantní teplotou 25 °C. Nastavení metody bylo stejné jako u předchozího testu. Amplituda deformace byla pro komplex TMC s ALG po celou dobu testu konstantní s hodnotou 0,02 % jež vyplývalo z LVO a rozsah frekvencí byl od 0,1 do 20 Hz. Pro komplexy TMC s SDS byla amplituda deformace 0,01 %.

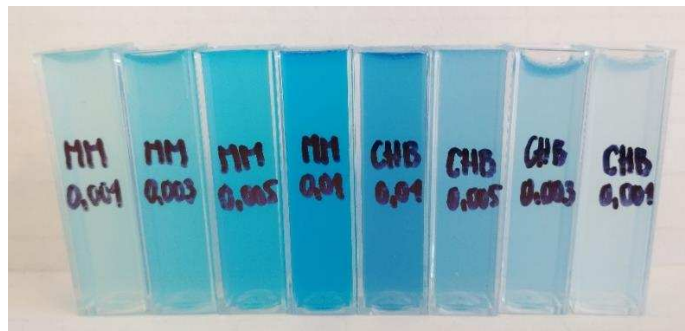
5.6 Příprava vzorků na transportní experimenty

Příprava vzorků

V roztoku TMC o koncentraci 1 g/l bylo rozpuštěno takové množství agarózy, aby vznikl 1% roztok. Za stálého míchání při 85 °C došlo k dokonalému rozpuštění roztoku a následnému přelití do spektrofotometrických (plastových) kyvet. Důležitým krokem bylo vytvoření „čepičky“ z horkého agarózového roztoku, která byla následně skalpelem odřezána v místě, kde kyveta končila. Tento krok byl vykonán po ztuhnutí gelu, jenž probíhalo 45 minut. Takto připravené 4 kyvety z roztoku TMC a další 4 z destilované vody byly ponořeny do roztoku vybraných barviv o koncentraci 0,01 g/l. Do lázní s 250 ml barviva byla vždy vložena jedna kyveta z destilované vody a druhá s přídavkem TMC. Lázně byly umístěny na míchačku a barvivo bylo kontinuálně promícháváno při 300 RPM, čímž byla zajištěna homogenní koncentrace barviva v průběhu celého experimentu, nedocházelo tedy k nežádoucím koncentračním gradientům. Tento děj probíhal současně v lázních s barvivem Chicago Blue (záporně nabitě barvivo) a Methylenovou modří (kladně nabitě barvivo).

Příprava koncentrační řady pro stanovení kalibrační závislosti

Pro konečné pracování výsledků byla vytvořena koncentrační řada agarózových kyvet s různými koncentracemi TMC a přidavkem barviva (vzorky pro kalibraci). Díky proměření těchto kalibračních roztoků bylo možné přepočítat naměřené hodnoty absorbance na koncentraci barviva prodifundovaného do různých vzdáleností od rozhraní kyveta-roztok. Postup byl shodný s předchozí přípravou vzorků až na tu výjimku, že kyvety se vzorkem byly obohaceny o fixní koncentraci barviva. Konkrétně se jednalo o následující koncentrace: 0,01; 0,005; 0,003; 0,001 g/l. Tato koncentrační řada byla připravena pro Methylenovou modř i Chicago Blue.

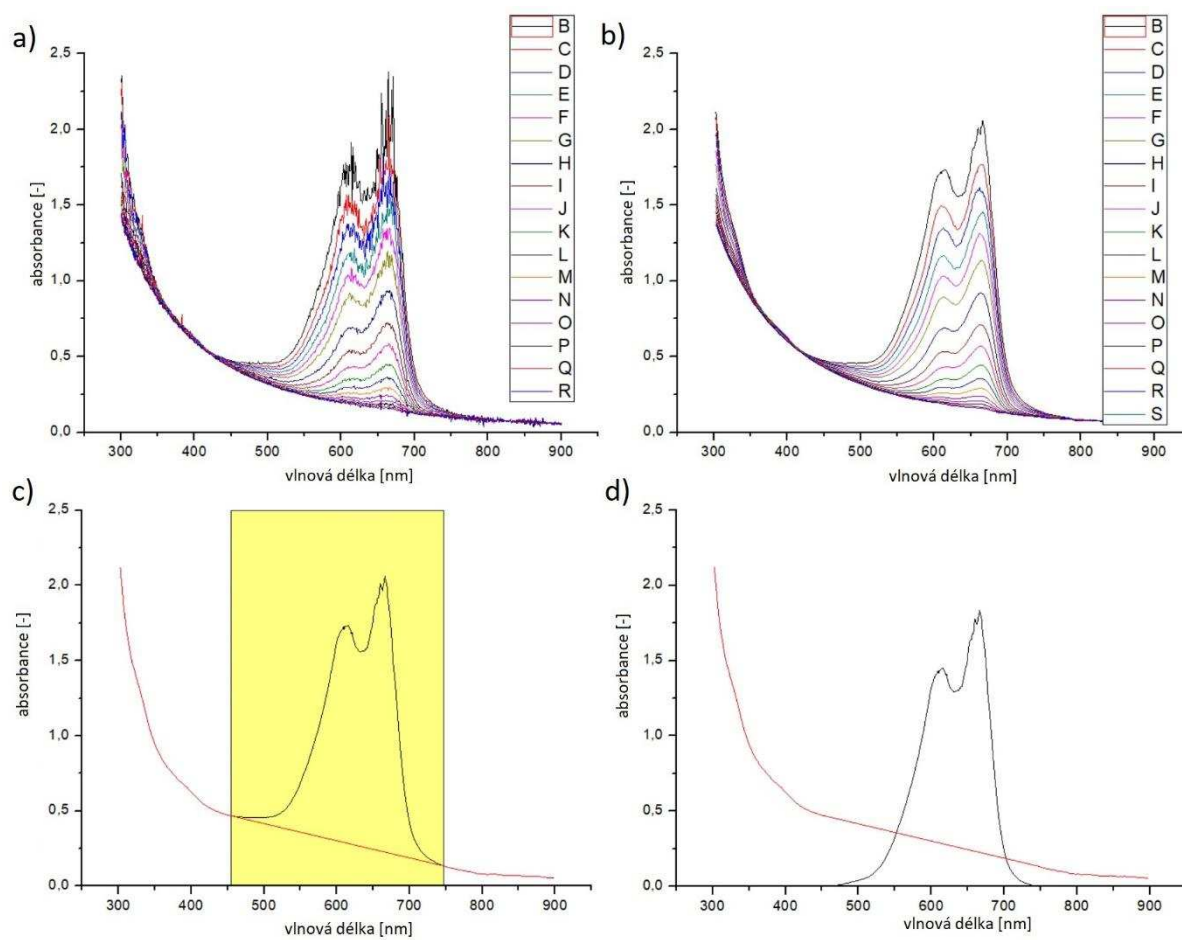


Obrázek 17: Koncentrační řada pro Methylenovou modř vlevo a pro Chicago Blue vpravo

Měření

Po 24 hodinách byla proměřena UV-VIS spektra vzorků hydrogelu s přidavkem TMC. Jako referenční vzorek sloužila čistá 1 hm% agaróza, který představovala pomocnou hydrogelovou matici, ve které byl transport barviva realizován. Došlo k prodifundování barviva do struktury gelů, a to zcela rozdílným způsobem u kladně a záporně nabitých barviv jako nám ukazuje Obrázek 27 viz kapitola 6.2. Z těchto důvodů byla proměřena celá kyveta za pomoci posuvného stojanu, jenž je montován v UV-VIS spektrofotometru Cary 50, který umožňuje stanovit absorpční UV-VIS spektra v různých místech kyvety. Díky tomuto nastavení byla každá z kyvet proměřena postupně po 1 mm v celém rozsahu ve zvolených časových intervalech – 24, 48, 72, 168, 336, 672 a 840 hodin.

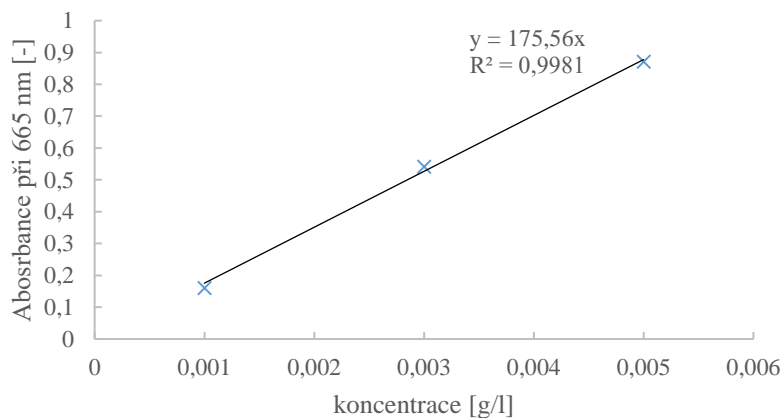
Veškerá spektra byla následně zpracována v programu Origin 8, kde v první řadě byla surová spektra (Obrázek 18 a) vyhlazena (Obrázek 18 b). V následujícím kroku byla spektra, která jsou kombinací agarózové matrice a prodifundovaného barviva rozdělena tak, že bylo odečteno spektrum agarózy (Obrázek 18 c). Následnou extrakcí této části spektra byla získána finální odečtená a vyhlazená spektra odpovídající organickému barvivu (Obrázek 18 d). Hlavním výstupem pak byla absorbance v závislosti na vzdálenosti od rozhraní kyvety pro výše uvedené časové intervaly. Absorbance byla zaznamenávána při vlnových délkách odpovídajících absorpčnímu maximu – pro Methylenovou modř 665 nm a pro Chicago Blue 620 nm.



Obrázek 18: Názorný postup úpravy v programu Origin

Připravená koncentrační řada a její hodnoty pak dále sloužily k převedení naměřených absorbancí na koncentraci za pomoci kalibrační křivky. Absorbance odpovídající maximu vlnové délky u koncentrační řady daly vzniku kalibrační závislosti, díky které lze vypočítat koncentraci v každé části kyvety.

U Methylenové modři nebyla brána v potaz hodnota kalibrační křivky pro koncentraci 0,01 g/l z důvodu příliš velké absorbance, která se projevowała nepřesnými hodnotami.



Obrázek 19: Příklad kalibrační závislosti pro Methylenovou modř

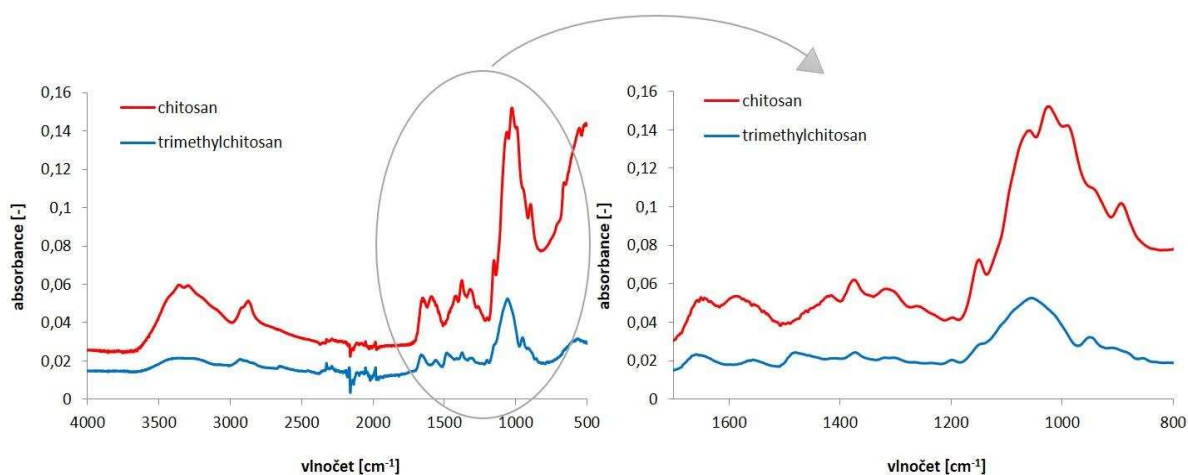
6 DISKUZE A VÝSLEDKY

6.1 Charakterizace nasyntetizovaného trimethylchitosanu

Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

První metodou potvrzující úspěšnou syntézu TMC je FTIR. Získané spektrum vyobrazené na Obrázku 20 představuje rozdíly mezi methylovaným a nemethylovaným chitosanem. Spektrum FTIR poskytuje řadu důkazů o methylaci chitosanu na trimethylchitosan, jež jsou viditelné převážně v oblasti $1700\text{--}800\text{ cm}^{-1}$. V oblasti vlnočtu s hodnotou $3353,6\text{ cm}^{-1}$ nemethylovaný chitosan disponuje charakteristickým pásem, který přísluší valenční vibraci N-H v primárních aminech ($-\text{NH}_2$), což potvrzuje skutečnost, že pík jeví patrné rozdělení na dva píky, jelikož primární aminoskupina obsahuje dva atomy vodíku. U TMC tento pík není rozdělen a absorpční maximum je posunuto k nižším vlnočtům. V oblasti vlnočtu s hodnotou $1587,13\text{ cm}^{-1}$ nemethylovaný chitosan vykazuje pík charakteristický pro sekundární aminy, jehož hodnota se při methylaci opět snižuje.

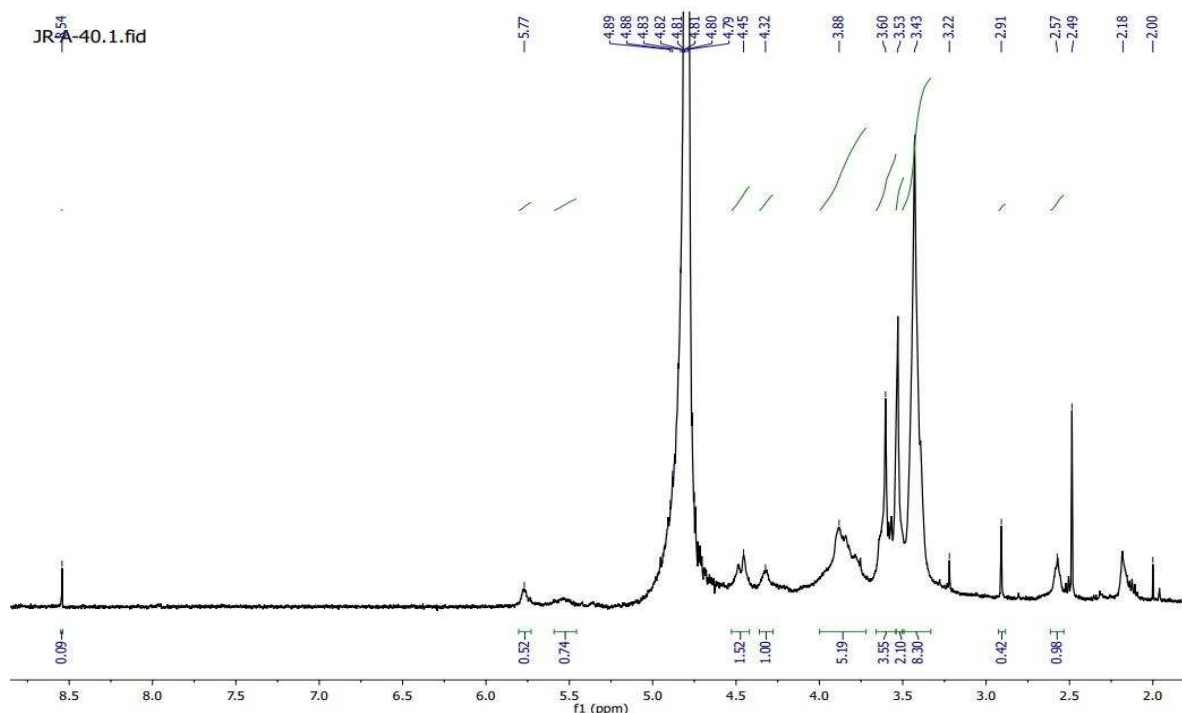
Hlavním důkazem je přítomnost nového pásu při hodnotě vlnočtu $1479,13\text{ cm}^{-1}$, kterým disponuje pouze TMC. Je to způsobeno valenčními vibracemi charakteristickými pro $-\text{CH}_3$ skupinu, které jsou právě přítomny po methylaci chitosanu. Nevyšší pásmo v oblasti $1150\text{--}1050\text{ cm}^{-1}$ představuje alkylové skupiny vázané přes kyslík, tedy valenční vibrace vazby C–O–C, jež jsou nežádoucí a nám známé jako O–methylace. Je to jeden z faktorů, jež ovlivňují rozpustnost TMC. I při sebevyšším stupni kvarternizace (DQ) může stoupající stupeň O–methylace (DOM) zásadně snižovat rozpustnost produktu.



Obrázek 20: Infračervené spektrum methylovaného i nemethylovaného chitosanu

Nukleární magnetická rezonance (NMR)

NMR je nejprůkaznější metodou pro určení do jaké míry byla methylace úspěšná. Díky ní jsme schopni určit stupeň kvarternizace (DQ), ale i stupeň O-methylace (DOM).



Obrázek 21: Naměřené NMR spektrum pro frakci s vyšším přidavkem NaCl – hrudky

Stupeň kvarternizace byl vypočítán dle následující rovnice:

$$DQ(\%) = \left[\frac{[(CH_3)_3]}{[H]} \cdot \frac{1}{9} \right] \cdot 100 = \left[\frac{8,3}{0,52+0,74} \cdot \frac{1}{9} \right] \cdot 100 = 73,19 \% \quad (1)$$

Stupeň O-methylace byl vypočítán dle následující rovnice:

$$DOM(\%) = \frac{[(CH_3)_3]}{[H]} \cdot \frac{1}{3} \cdot 100 = \frac{2,10}{0,52+0,74} \cdot \frac{1}{3} \cdot 100 = 55,56 \% \quad (2)$$

kde $[(CH_3)_3]$ představuje integrál trimethylovaných aminoskupin při 3,43 ppm, $[H]$ představuje integrály 1H v rozmezí 4,7 až 5,7 ppm. V rozmezí 3,53 až 3,60 se nacházejí píky odpovídající O-methylaci ($O-CH_3$) a $[H]$ představuje hodnoty v rozmezí od 4,7 až 5,7 ppm [10].

Výpočtem bylo zjištěno, že výtěžek 3 různých frakcí a vzhledů má jiné stupně kvarternizace. TMC s vyšším množstvím NaCl použitým při přípravě disponuje stupněm kvarternizace 47,03 % a stupněm O-methylace (DOM) pro 3,53 ppm byl 42,26 % a pro 3,6 ppm 51,85 %. Produkt, který byl syntetizován s nižším přidavkem NaCl byl rozdělen na dvě frakce – hrudky a prášek. Frakce hrudky jevila $DQ = 73,19 \%$ a $DOM = 55,55 \%$ při 3,53 ppm a 93,92 % pro 3,6 ppm. Na druhou stranu frakce prášek měla $DQ = 61,26 \%$ a $DOM = 61,84 \%$ pro 3,53 ppm a 56,80 % pro 3,6 ppm.

Z výsledků je zřejmé, že změnou reakčních podmínek a objemů reagentů potřebných k methylaci lze připravit TMC o různých DQ a DOM.

Elementární analýza

Další z metod potvrzující úspěšnou metylaci chitosanu na trimethylchitosan je právě elementární analýza. Tabulka 3 ukazuje procentuální zastoupení jednotlivých prvků, které se patrně liší v závislosti na následné methylaci.

Tabulka 3: *Výsledky elementární analýzy methylovaného i nemethylovaného chitosanu*

	N [hm %]	C [hm %]	H [hm %]	O [hm %]	C/H [-]
Chitosan	$7,7 \pm 0,1$	$44 \pm 0,2$	$6,82 \pm 0,05$	$40,9 \pm 0,6$	$6,45 \pm 0,06$
TMC	$5,9 \pm 0,5$	$43,6 \pm 0,4$	$8,8 \pm 0,2$	$41,7 \pm 0,3$	$4,95 \pm 0,12$

U dusíku je patrný procentuální pokles, ačkoliv nedocházelo při methylaci k snižování množství N. K poklesu došlo z důvodu methylace, která se projevila v procentuálním nárůstu u vodíku a uhlíku. Nárůst u uhlíku není tak znatelný ba naopak se jeví jako pokles. Tento pokles proběh na úkor nárůstu vodíku, který je trojnásobný oproti nárůstu uhlíku.

Poměr C/H nám uvádí skutečnost, že nárůst vodíků bude téměř trojnásobný oproti nárůstu uhlíků a z tohoto důvodu zmíněný poměr klesá. Vše vychází ze skutečnosti, že methylací je aminoskupina ($-\text{NH}_2$) substituována methylovými skupinami za vzniku amoniové soli ($-\text{N}(\text{CH}_3)_3$).

Z naměřených hodnot lze říct, že elementární analýza potvrdila úspěšnou methylaci TMC.

Samotná syntéza byla velice náročná, a to nejen časově, ale i úpravou a stanovením správného postupu. Časem tedy docházelo k úpravě postupu methylace, jenž vedlo k finálnímu produktu TMC. Než byl nasyntetizován TMC, prošel si finální produkt řadou změn, jak ukazuje *Obrázek 22*. Od tmavě červené kapaliny jsme se dostali ke krystalické bílé látce, která byla prověřena výše zmíněnými metodami, které potvrdily, že je opravdu jedná o trimethylchitosan. Za povšimnutí stojí progres skupenství (z gelovité kapaliny na krystalický prášek), barvy (z tmavě červené, přes všechny odstíny hnědé až po bílou), množství (překonali všeskeré extrémy) a struktury (některé produkty se jevíly tvrdé jako kámen, jiné však jemné a sypké). Tyto všechny poznatky nás však dovedly k výsledku. Podrobnější popis přípravy a úprav je zmíněn v kapitole 5.2.



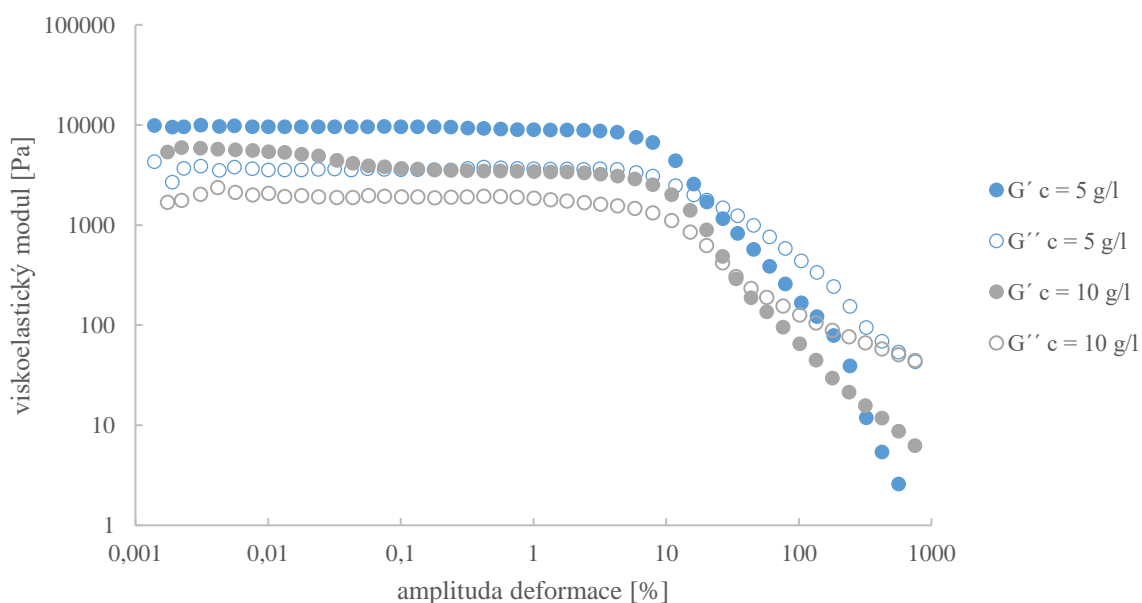
Obrázek 22: *Progres v přípravě trimethylchitosanu*

6.2 Charakterizace hydrogelů

Reologie

Pomocí této metody bylo provedeno stanovení viskoelastických vlastností hydrogelů, jež si kladlo za cíl potvrdit, či vyvrátit, že se jedná o gely. Díky vzniku hydrogelů na bázi TMC bychom mohli prokázat pozitivní interakce mezi syntetizovaným TMC a opačně nabitými polysacharidy či tenzidy. Celková charakteristika byla provedena pomocí dvou na sobě závislých testů – amplitudový test s konstantní frekvencí oscilací (viz kapitola 5.5) a frekvenční test s konstantní amplitudou deformace zvolenou z lineární viskoelastické oblasti (LVO). Tato měření byla prováděna u vzorků zmíněných v kapitole 5.4 ve dvojím opakování.

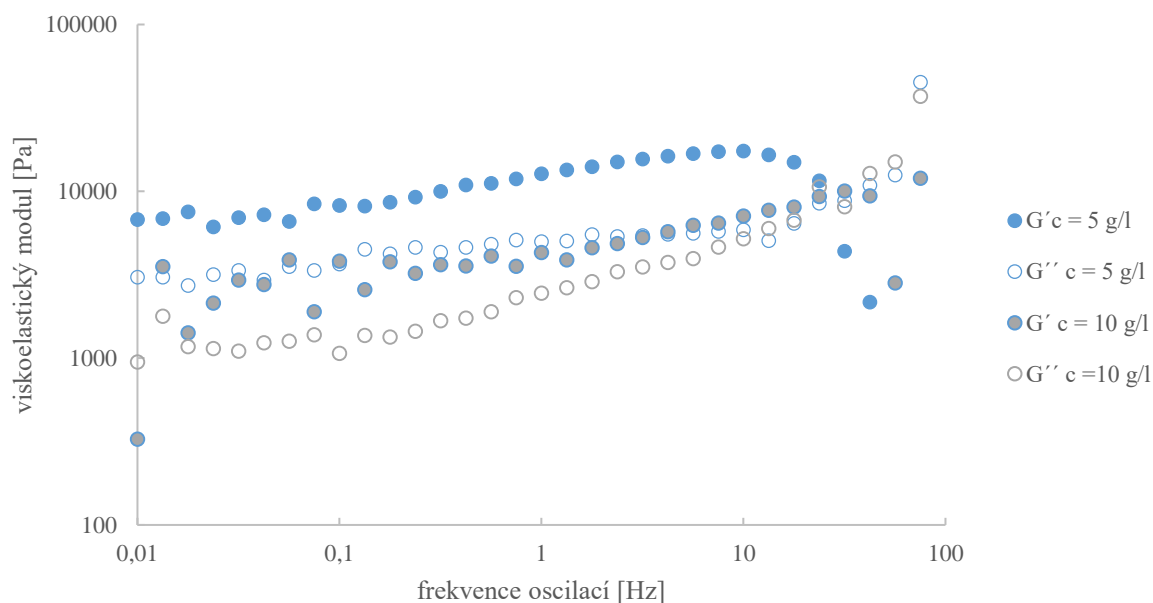
První byly prověřeny gely, které vznikly interakcí roztoků **alginátu o různé koncentraci s roztokem TMC**. Pro stanovení lineární viskoelastické oblasti (LVO) byl v první řadě proveden test s proměnou amplitudou deformace a konstantní frekvencí oscilací – strain sweep. Za pomoci tohoto testu byla zjištěna široká oblast LVO pro ALG gely v rozmezí 0,001 – 8 % amplitudy deformace. Takový rozsah je velice zajímavý z důvodu toho, že většina hydrogelů disponuje rozsahem kratším a to od 0 % [28]. Elastický modul G' převyšoval nad modulem viskózním G'' přibližně do hodnoty amplitudy deformace 10 %. Za touto hranicí je nevratně zdeformován, a proto byla vybrána pro následující frekvenční test konstantní amplituda deformace 0,02 %.



Obrázek 23: Amplitudový test pro alginátové hydrogely s TMC lišící se svou koncentrací

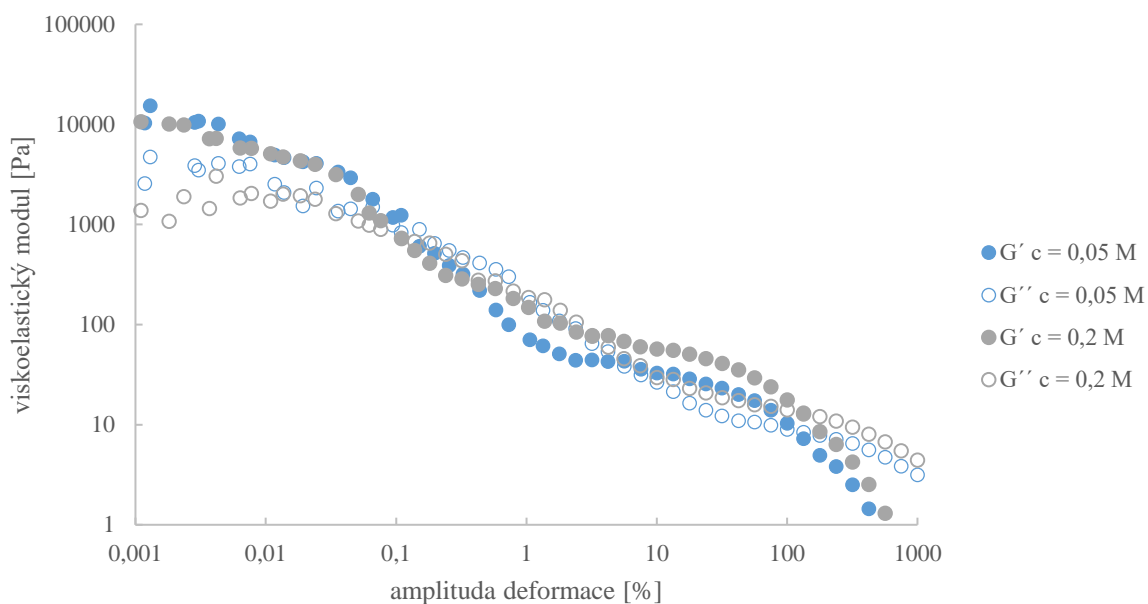
Druhým testem je již zmiňovaný frekvenční test, který je založen na konstantní amplitudě deformace a měnící se frekvenci oscilací. Obrázek 24 znázorňuje měření dvou různých vzorků gelů lišících se koncentrací ALG, jenž se chovají podobně a potvrzuje skutečnost, že jejich mechanické vlastnosti jsou podobné. Připravené hydrogely disponují plně sesíťovanou strukturou, jelikož elastický modul G' převyšuje modul viskózní G'' v celém svém rozsahu. Zajímavostí je, že hydrogel připravený z roztoku ALG s nižší koncentrací disponují téměř o řád vyššími moduly než hydrogel s vyšší koncentrací. To značí menší rigiditu u vzorků s vyšší

koncentrací, z čehož vyplývá menší odolnost vůči mechanickým vlivům. Dále můžeme v grafu sledovat bod překřížení („*cross-over point*“) a to lehce za 10 Hz. V tomto místě převáží viskózní modul G'' nad modulem elastickým G' a dochází k překřížení modulů. Modul elastický vyjadřuje energii uloženou v materiálu během působení napětí a je typický pro pevné látky, kdežto viskózní modul je používán u kapalin a sděluje ztrátu energie během působení napětí. Tyto dva modely pak určují přesnou hranici v chování mezi pevnou a kapalnou fází a projevují se již zmíněným překřížením. Pokles elastického modulu při nejvyšších frekvencích byl způsoben prokluzem senzoru a působící deformací se rozvolnily vazby, které držely gel pohromadě a vznikla tak viskoelastická kapalina s převahou viskozity.



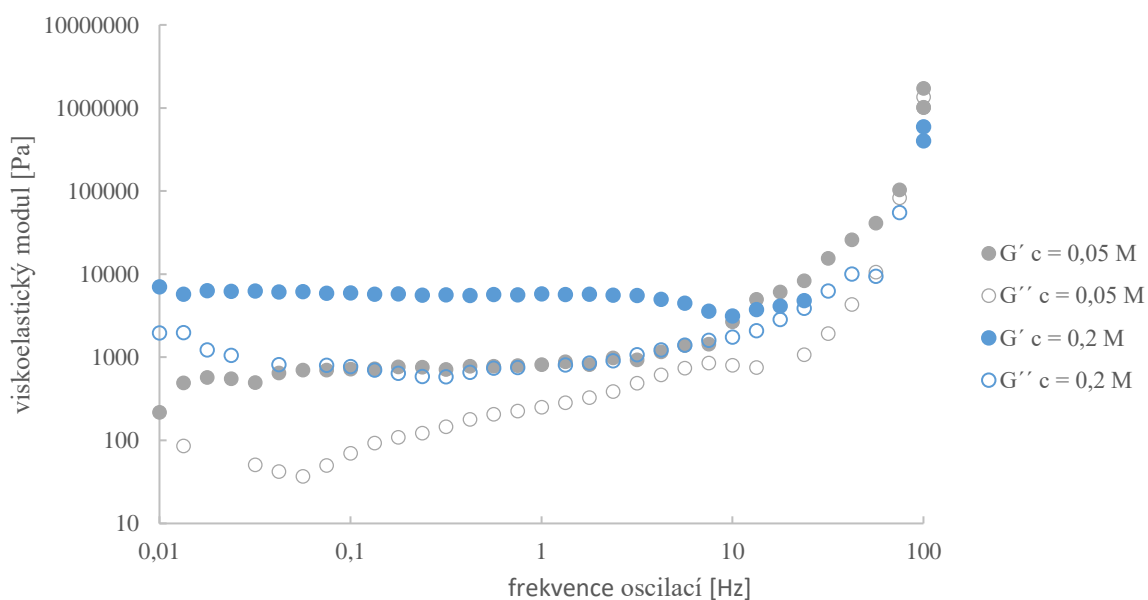
Obrázek 24: Frekvenční test pro alginátové hydrogely s TMC lišící se svou koncentrací

Dále byly proměřeny hydrogely připravené z roztoků **SDS o různých koncentracích s trimethylchitosanovým roztokem**. Jako první byly gely opět podrobeny amplitudovému testu. Z výsledku je patrné, že elastický modul G' převažuje nad viskózním modulem G'' ve dvou částech. Zajímavým úkazem je právě pokles elastického modulu v oblasti od 0,1 – 1 % amplitudy deformace. Důvodem může být struktura síťovaného hydrogelu. K poklesu tedy může docházet při rozpoutání primární síťové struktury a díky sekundárním vazbám, jež jsou zakódovány v kostře gelu dochází k opětovnému vyrovnání modulů do původní formace. Pro LVO byla vybrána hodnota amplitudy deformace 0,01 %, která je jeví jako lineární a modul G' zde převažuje nad G'' .



Obrázek 25: Amplitudový test pro SDS hydrogely s TMC lišící se svou koncentrací

V rozsahu frekvencí 0,01 až 20 Hz byl měřen frekvenční test, který je vyobrazen na Obrázku 26. Při porovnání dvou připravených hydrogelů o různých koncentracích můžeme pozorovat značnou podobnost průběhu deformace, jež značí mechanickou podobnost připravovaných vzorků. Na rozdíl od předchozího příkladu koncentrovanější gel disponuje vyššími viskoelastickými moduly, než gel s nižší koncentrací a tím pádem i nižšími mechanickými vlastnostmi. Hlavním závěrem a důkazem vzniku hydrogelů je převyšující elastický modul nad viskózním až do hodnoty 10 Hz. Právě v tomto bodě dochází k překřížení modulů a zničení struktury gelu.



Obrázek 26: Frekvenční test pro SDS hydrogely s TMC lišící se svou koncentrací

U všech připravovaných vzorků můžeme potvrdit, že se jednalo o gely, jelikož elastický modul G' převyšoval modul viskózní G'' až do hodnoty amplitudy deformace. Díky většímu množství měření lze tvrdit, že připravované gely jsou konzistentní a s možností opakování experimentu.

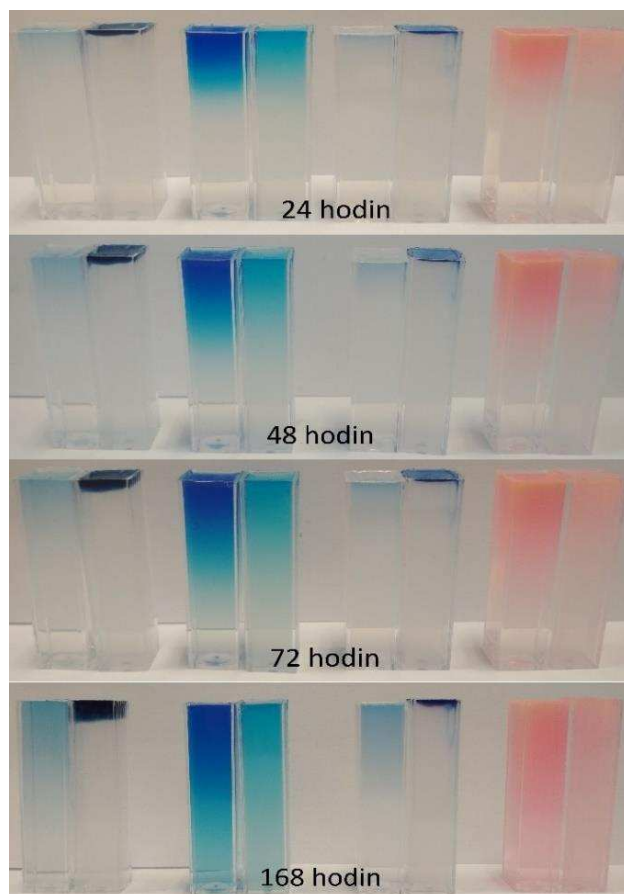
Z výše uvedených grafů lze taktéž tvrdit, že změna koncentrace SDS nebo ALG výrazně mění a ovlivňuje mechanické vlastnosti připravovaných hydrogelů. U hydrogelů tvořených z SDS je vyšší koncentrace spojena s lepšími mechanickými vlastnostmi a u ALG je tomu naopak. Koncentrace SDS a ALG však neovlivňuje rigiditu čili pevnost řetězců ve vnitřní struktuře gelu, což je viditelné u bodu křížení, který je pro různé koncentrace ve stejné hodnotě.

Měřeními jsme potvrdili interakci TMC se záporně nabitými látkami, při níž vznikají gely s plně síťovanou strukturou. Z výše uvedených oscilačních testů můžeme soudit, že všechny měřené hydrogely vykazují viskoelastické chování s převahou elasticity v celém svém rozsahu měření.

Transportní a bariérové experimenty

Tato metoda byla zvolena pro pozorování, jakým způsobem interaguje kladně nabitý TMC v agarózovém gelu za pomoci difúze opačně nabitého barviva dovnitř agarózového hydrogelu obohaceného o TMC. Pro názornější posouzení byly vybrány dvě barviva s rozdílným nábojem, do kterých byly ponořeny kyvety s agarózovým gelem a paralelně k tomu byly připraveny agarózové kyvety s přídavkem TMC o koncentraci 10 g/l. Takto byly pozorovány rozdíly difúze bez/s TMC s kladně/záporně nabitým barvivem. Na základě tohoto experimentu jsme schopni posoudit, do jaké míry ovlivňuje přídavek TMC průchod difúzní sondy hydrogelem. Celé měření probíhalo pomocí nedestruktivní spektrofotometrické metody (UV-VIS), která využívá vlastnosti organických barviv pohlcovat světlo o určité vlnové délce. Právě šetrnost metody může být využívána pro pozorování s ohledem na cílenou distribuci léčiv.

Pro správné vyhodnocení byly zprvu vyhotoveny 4 lázně s rozdílnými barvivami. Konkrétně se jednalo o kladně nabitý Rhodamin a Methylenovou modř, dále pak o záporně nabitý Chicago Blue a Amidoschwarz. Do těchto lázní byly ponořeny vždy dvě kyvety – jedna s čistým agarem a druhá s přídavkem TMC. Po týdenním pozorování byl z výběru vyloučen Rhodamin a Amidoschwarz. Pro následující transportní experimenty byl vybrán zástupce kationaktivních – Methylenová modř (MM) z důvodu názornější viditelnosti a za anionaktivní Chicago Blue (CHB) i přestože má větší molekulovou hmotnost bylo zakoncentrování barviva na rozhraní hydrogel-roztok nižší než u Amidoschwarzi.



Obrázek 27: Dvojice 1% čistých agarózových gelů (levá kyveta) a s přidavkem TMC (pravá kyveta) zaznamenané v časech 24, 48, 72 a 168 hodin při probíhající difúzi v lázních z barviv (zleva) Amidoschwarz, Methylenová modř, Amidoschwarz a Rhodamin

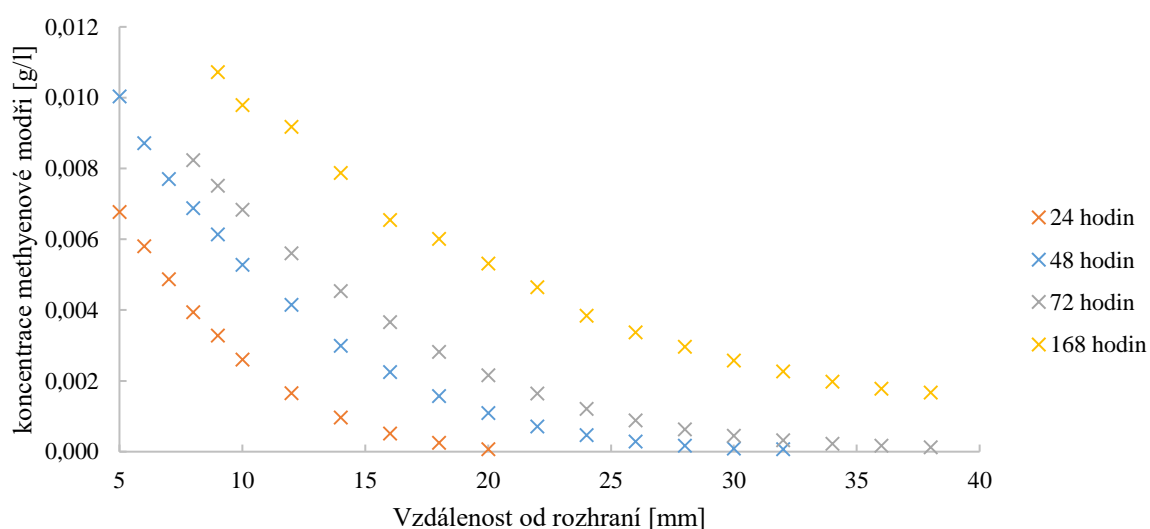
Na základě tohoto úsudku pak byly proměřeny kyvety z lázní s MM a CHB v časech 24, 48, 72, 168, 336, 672 a 840 hodin. Zaznamenané absorbance v závislosti na vzdálenosti od rozhraní kyvety pak byly převedeny na koncentrace barviva, jak již bylo blíže popsáno v kapitole 5.6.

Kyvety ponořené v barvivo Methylenové modři vykazovaly mnohem rychlejší penetraci, než tomu bylo u Chicago Blue. Z tohoto důvodu jsou zmíněny jen výsledky ne delší než 168 hodin. Za tuto dobu došlo k prostupu barviva až na konec kyvety. Tuto skutečnost si můžeme vysvětlit díky náboji barviva, jenž je shodný s nábojem TMC a tím pádem nedochází k interakcím, které by zpomalovaly průběh prostupu barviva kyvetou.

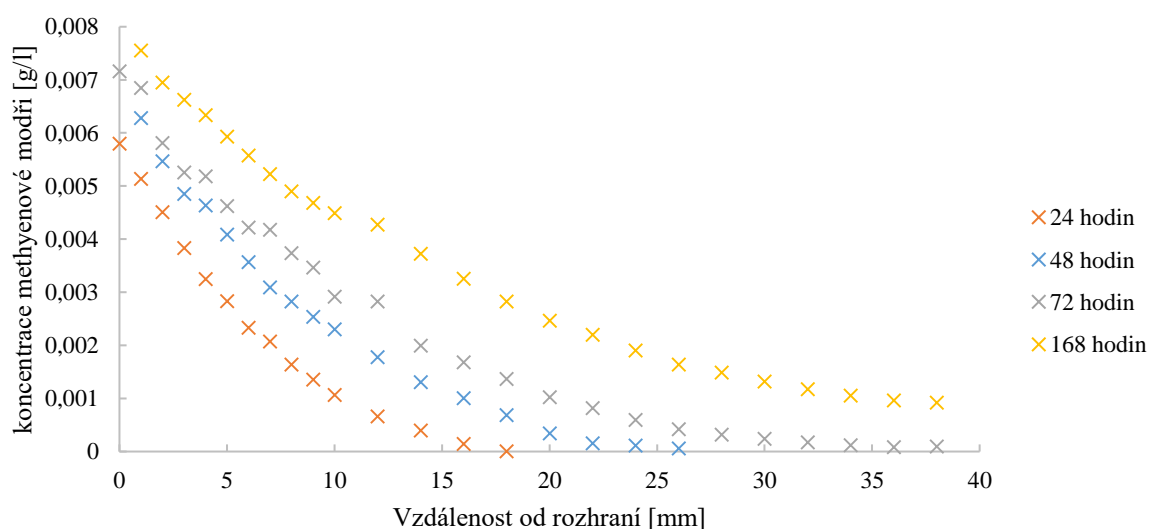


Obrázek 28: Difúze v čistém agarózovém gelu (vlevo) a s přidavkem TMC (vpravo) v lázni s Methylenovou modří (v časech 24, 48, 72, 168 hodin)

Jak nám ukazuje *Obrázek 28* je prostup čistým agarem zhruba stejný jako prostup agarózou s přidavkem TMC. Mění se však koncentrace, která je menší u kyvet s přidavkem TMC. O pravdivosti informace nás můžou ujistit výsledky měření, které vyobrazuje *Obrázek 29* a *Obrázek 30*. Tyto grafy ukazují, že prostup a průběh difúze se velice podobný, avšak osa koncentrací se liší. V kyvetách s čistou agarózou je prokazatelně vyšší koncentrace barviva, než je tomu u kyvet s přidavkem TMC. *Obrázek 29* ukazuje, že koncentrace na rozhraní po 48 hodinách v kyvetě s čistou agarózou je stejná jako koncentrace roztoku organického barviva (0,010 g/l), ve kterém byla kyveta vložena. Po stejně dlouhé době v případě kyvety s přidavkem TMC pozorujeme, že je koncentrace na rozhraní je nižší (0,007 g/l), což je způsobeno složením agarózového gelu. Přidavek TMC nejspíše brání transportu barviva a koncentrace je proto ve stejném časovém intervalu nižší.

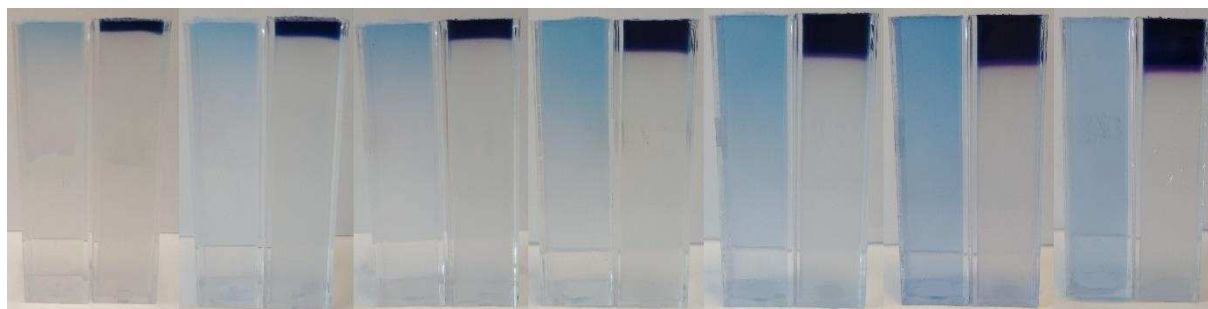


Obrázek 29: Koncentrace Methylenové modři v závislosti na vzdálenosti od rozhraní kyveta-roztok v kyvetě a čistou agarózou



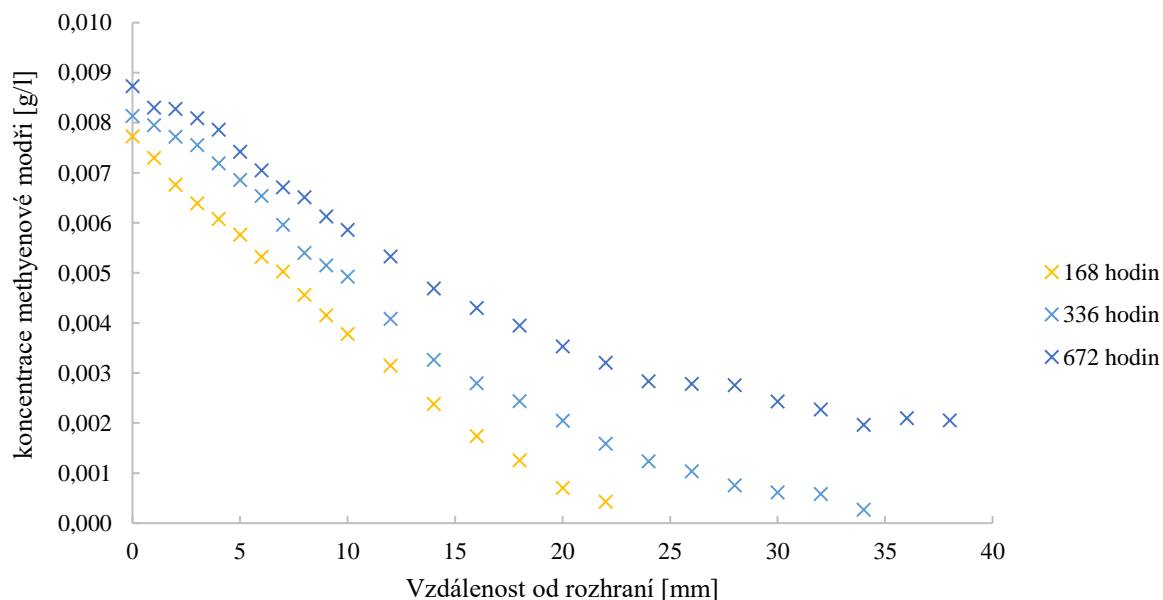
Obrázek 30: Koncentrace Methylenové modři v závislosti na vzdálenosti od rozhraní kyveta-roztok v kyvetě s agarózou a s přidavkem TMC

Transport anionaktivního barviva Chicaga Blue do agarózového gelu vystihuje *Obrázek 31*. Vizuálním pozorováním je patrné, že přídavek TMC zpomaluje transport CHB do struktury gelu zcela významně. Jak již barva napovídá, TMC zamezuje prostupu barviva a dochází k zakoncentrovávání tak na rozhraní hydrogel – roztok. Je to dáno tím, že dochází k interakci kladně nabitého trimethylchitosanu a záporně nabitého barviva Chicaga Blue. Během 840 hodin se dokázalo barvivo v kyvetě bez přídavku TMC prodifundovat až na konec kyvety. V kyvetě s přídavkem TMC však ani po tak dlouhé době nedošlo k nikterak závratnému prostupu. Ba naopak díky zakoncentrovávání barviva na začátku kyvety dalo vzniku tak tmavé barvy, která spektrometrickým měřením nebyla detekovatelná, a proto nemáme žádná data znázorňující koncentraci CHB v závislosti na vzdálenosti. Toto pozorování je potvrzením interakcí, které probíhá mezi barvivem a TMC.



Obrázek 31: Difúze v čistém agarózovém gelu (vlevo) a s přídavkem TMC (vpravo) v lázni s Chicagem Blue (v časech 24, 48, 72, 168, 336, 840 hodin)

Obrázek 32 tedy znázorňuje prostup barviva kyvetou bez přídavku TMC. Je viditelná nízká koncentrace a celkový prostup kyvetou. Vybrány byly data od 168 – 672 hodin, na kterých jde nejlépe vidět, že difúze probíhá neustále a v celém rozsahu.



Obrázek 32: Koncentrace Chicaga Blue v závislosti na vzdálenosti od rozhraní kyveta-roztok v kyvetě s čistou agarózou

7 ZÁVĚR

Bakalářská práce si kladla za cíl nasyntetizovat N, N, N – trimethylchitosan, provést základní charakterizaci trimethylchitosanu pomocí vhodných fyzikálně-chemických metod a následně experimentálně ověřit možnosti interakce trimethylchitosanu s variabilně nabitými sloučeninami.

Základem celé práce byla syntéza TMC. Nastudováním všech doposud zveřejněných prací o syntéze byl vytvořen postup, který se jevil jako nejvhodnější. Syntéza byla reprodukována dle práce A.B. Sievala, jež byla inovována ostatními články. Výsledkem byl výtěžek 5,323 g. Skutečnost, že se jedná o TMC byla potvrzena třemi analytickými metodami. Elementární analýza potvrdila metylaci, díky navýšení prvků odpovídajících methylové skupině. Porovnáním spektra chitosanu a výtěžku dokázala infračervená spektroskopie potvrdit úspěšnou metylaci díky valenčním vibracím odpovídajícím N-H vazbám. Poslední metodou byla nukleární magnetická rezonance, jež odhalila stupeň kvarternizace výsledného produktu, jenž činil 47,03 %, 61,26 % a 73,19 % pro tři různé frakce.

Dílčím cílem práce bylo studium interakce polykationtu a aniontových protilátek. Tyto reakce byly zkoumány prostřednictvím dvou metod, a to reologických a difúzních měření.

Reologická měření měla za úkol definovat mechanické vlastnosti připravovaných hydrogelů v závislosti na koncentraci použitých látek. Z reologických měření vyplývá, že připravené hydrogely disponují plně sesíťovanou strukturou, protože elastický modul převyšuje modul viskózní. V závislosti na použitých aniontových látkách a koncentracích jsou ovlivněny výsledné mechanické vlastnosti. Zvláštní situaci tvořily hydrogely ALG-TMC, kdy nižší koncentrace ALG vedla k pevnějšímu gelu. U SDS-TMC tomu bylo naopak.

Aby bylo difúzní měření autentické a simulovalo tak možný přenos léčiv, byly připraveny dva modely agarózového gelu v kyvetě, kdy jedna z kyvet obsahovala přídavek TMC a druhé byla naplněna čistým agarem. Takto připravené kyvety byly ponořeny do roztoků s kladně i záporně nabitými organickými barvivými a byl sledován vliv času na prostup rozdílným prostředím po dobu jednoho týdne. Je známo, že opačně nabité látky společně reagují, a proto kyvety s kladně nabitým TMC a záporně nabitým barvivem Chicago Blue se zakoncentrovaly blízko rozhraní kyvety. Naopak u kladně nabitého barviva Methylenové modři docházelo k rychlému prostupu kyvetou. Zajímavým zjištěním byl fakt, že koncentrace vytvořená na rozhraní agarózového gelu s přídavkem TMC v Chicago Blue je velká natolik, až není možné ji spektrofotometricky stanovit. Naopak u Methylenové modři byla zaznamenána vyšší koncentrace u vzorků bez TMC.

Trimethylchitosan je úžasnou a doposud ne zcela probádanou látkou, jež číší nepřeborným množstvím využití. Charakter této látky je jedinečný a potenciální využití široké. Chitosan si již svou velkou chvíli slávy užil a teď je řada na jeho následníku trimethylchitosanu. Díky jeho biokompatibilitě, biodegradabilitě, netoxičnosti a navíc rozpustnosti ve vodě je vhodným kandidátem pro medicínské užití nosiče léčiv. Chitosanové náplasti by tak proto mohly mít nového a lepšího nástupce. Tato neznámá a velice zajímavá oblast vývoje využití je nejen pro mě další motivací k výzkumu.

8 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] LIU, Haiyang, Bimlesh OJHA, Clifford MORRIS, Mengting JIANG, Ewa P. WOJCIKIEWICZ, Praveen P. N. RAO a Deguo DU, 2015. Positively Charged Chitosan and N-Trimethyl Chitosan Inhibit A β 40 Fibrillogenesis. *Biomacromolecules*. **16**(8), 2363-2373. DOI: 10.1021/acs.biomac.5b00603.
- [2] SAHARIAH, Priyanka a Már MÁSSON, 2017. Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives: A Review of the Structure–Activity Relationship. *Biomacromolecules*. **18**(11), 3846-3868. DOI: 10.1021/acs.biomac.7b01058.
- [3] VAVŘÍKOVÁ, Eva a Jarmila VINŠOVÁ. Chitosan and Its Pharmaceutical Applications. In: *Chemicke listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2009. ISSN 0009-2770.
- [4] THANOU, Maya M, J.Coos VERHOEF, Stefan G ROMELIJN, J.Fred NAGELKERKE, Frans W.H.M MERKUS a Hans E JUNGINGER, 1999. Effects of N-trimethyl chitosan chloride, a novel absorption enhancer, on Caco-2 intestinal epithelia and the ciliary beat frequency of chicken embryo trachea. *International Journal of Pharmaceutics*. **185**(1), 73-82. DOI: 10.1016/S0378-5173(99)00126-X.
- [5] HSU, Li-Wen, Pei-Ling LEE, Chiung-Tong CHEN, Fwu-Long MI, Jyuhn-Huarng JUANG, Shiaw-Min HWANG, Yi-Cheng HO a Hsing-Wen SUNG, 2012. *Biomaterials*. **33**(26). DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.05.013.
- [6] CHEUNG, Randy, Tzi NG, Jack WONG a Wai CHAN. Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Marine Drugs*. 2015, **13**(8), 5156-5186. DOI: 10.3390/md13085156.
- [7] AHMED, Shakeel a Saiqa IKRAM, 2017. Chitosan: derivatives, composites and applications. Hoboken, NJ, USA: Wiley. ISBN 978-111-9364-818.
- [8] BELLICH, Barbara, Ilenia D'AGOSTINO, Sabrina SEMERARO, Amelia GAMINI a Attilio CESÀRO, 2017. "The Good, the Bad and the Ugly" of Chitosans. *Advances in Marine Chitin and Chitosan II*. **2016**(14(5)), 99. DOI: 10.3390/md14050099.
- [9] DE BRITTO, Douglas, Lucimara Aparecida FORATO a Odílio B.G. ASSIS, 2008. Determination of the average degree of quaternization of N,N,N-trimethylchitosan by solid state ¹³C NMR. *Carbohydrate Polymers*. **74**(1), 86-91. DOI: 10.1016/j.carbpol.2008.01.021.
- [10] MOURYA, V. K. a Nazma N. INAMDAR, 2009. Trimethyl chitosan and its applications in drug delivery. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. **20**(5), 1057-1079. DOI: 10.1007/s10856-008-3659-z.
- [11] M. WAYS, Twana, Wing LAU a Vitaliy KHUTORYANSKIY, 2018. Chitosan and Its Derivatives for Application in Mucoadhesive Drug Delivery Systems. *Polymers*. **10**(3), 267. DOI: 10.3390/polym10030267.

- [12] FARN, Richard J, 2006. Chemistry and technology of surfactants. 1. Ames, Iowa: Blackwell Pub. ISBN 978-14051-2696-0.
- [13] HOLMBERG, T., B. JÖNSSON, B. KRONBERG, B. LINDMAN. Surfactants and Polymers in Aqueous Solution. 2. vyd. Wiley. 562 s. 2002. ISBN: 0-471-49883-1
- [14] ŠMIDRKAL, J. Tenzidy a detergenty dnes. Chem. Listy 93, 1999, s. 421-427.
- [15] SIEVAL, A.B., M. THANOU, A.F. KOTZE', J.C. VERHOEF, J. BRUSSEE a H.E. JUNGINGER, 1998. Preparation and NMR characterization of highly substituted N-trimethyl chitosan chloride. Carbohydrate Polymers. **36**(2-3), 157-165. DOI: 10.1016/S0144-8617(98)00009-5.
- [16] DOMARD, A., M. RINAUDO a C. TERRASSIN, 1986. New method for the quaternization of chitosan: note II. International Journal of Biological Macromolecules [online]. 1986, **8**(2), 105-107 [cit. 2018-04-11]. DOI: 10.1016/0141-8130(86)90007-3.
- [17] THANOU, Maya M, J.Coos VERHOEF, Stefan G ROMEIJN, J.Fred NAGELKERKE, Frans W.H.M MERKUS a Hans E JUNGINGER, 1999. Effects of N-trimethyl chitosan chloride, a novel absorption enhancer, on Caco-2 intestinal epithelia and the ciliary beat frequency of chicken embryo trachea: the origin, evolution, and impact of doi moi. International Journal of Pharmaceutics. 2000, **185**(1), 73-82. DOI: 10.1016/S0378-5173(99)00126-X.
- [18] XU, Jiaojiao, Beihua XU, Dan SHOU, Xiaojing XIA a Ying HU, 2015. Preparation and Evaluation of Vancomycin-Loaded N-trimethyl Chitosan Nanoparticles. Polymers. **7**(9), 1850-1870. DOI: 10.3390/polym7091488.
- [19] VERHEUL, Rolf J., Maryam AMIDI, Steffen VAN DER WAL, Elly VAN RIET, Wim JISKOOT a Wim E. HENNINK, 2008. Synthesis, characterization and in vitro biological properties of O-methyl free N,N,N-trimethylated chitosan. Biomaterials. **29**(27), 3642-3649. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.05.026.
- [20] MUZZARELLI, Riccardo A.A. a Fabio TANFANI, 1985. The N-permethylation of chitosan and the preparation of N-trimethyl chitosan iodide. Carbohydrate Polymers. **5**(4), 297-307. DOI: 10.1016/0144-8617(85)90037-2.
- [21] RADEVA, Tsetska. Physical chemistry of polyelectrolytes. New York: Marcel Dekker, 2001. Surfactant science series, v. 99. ISBN 08-247-0463-0.
- [22] YOUNG, Jenn-jong, Cheng-cheung CHEN, Ying-chuan CHEN, Kuang-ming CHENG, Hui-Ju YEN, Yu-chuan HUANG a Tsung-Neng TSAI, 2016. Positively and negatively surface-charged chondroitin sulfate-trimethylchitosan nanoparticles as protein carriers. Carbohydrate Polymers. **137**, 532-540. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.10.095.
- [23] PALIWAL, Rishi, Shivani R. PALIWAL, Govind P. AGRAWAL a Suresh P. VYAS, 2012. Chitosan nanoconstructs for improved oral delivery of low molecular weight heparin: In vitro and in vivo evaluation. International Journal of Pharmaceutics. **422**(1-2), 179-184. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.10.048.

- [24] MARTINS, Alessandro F., Pedro V.A. BUENO, Elizângela A.M.S. ALMEIDA, Francisco H.A. RODRIGUES, Adley F. RUBIRA a Edvani C. MUNIZ, 2013. Characterization of N-trimethyl chitosan/alginate complexes and curcumin release. *International Journal of Biological Macromolecules*. **57**, 174-184. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2013.03.029.
- [25] JIN, Yun, Yupin SONG, Xi ZHU, Dan ZHOU, Chunhui CHEN, Zhirong ZHANG a Yuan HUANG, 2012. Goblet cell-targeting nanoparticles for oral insulin delivery and the influence of mucus on insulin transport. *Biomaterials*. **33**(5), 1573-1582. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.10.075.
- [26] MANSUR, Herman S., Alexandra A.P. MANSUR, Elisabete CURTI a Mauro V. DE ALMEIDA, 2012. Bioconjugation of quantum-dots with chitosan and N,N,N-trimethyl chitosan. *Carbohydrate Polymers*. **90**(1), 189-196. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.05.022.
- [27] MITHUN, U., B. VISHALAKSHI a J. KARTHIKA. Preparation and characterization of polyelectrolyte complex of N , N , N -trimethyl chitosan/gellan gum: evaluation for controlled release of ketoprofen. *Iranian Polymer Journal*. Berlin/Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2016, **25**(4), 339-348. DOI: 10.1007/s13726-016-0425-9. ISSN 1026-1265.
- [28] ROUESSAC, Francis. a Annick. ROUESSAC, c2007. *Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques*. 2nd ed. Hoboken, NJ: John Wiley. ISBN 978-047-0859-049.
- [29] HÁJEK, Milan., 1989. *Kvantitativní FT NMR spektroskopie v chemické praxi*. Praha: Academia. ISBN 80-200-0096-8.
- [30] ROSENBLATT, Joel, Brian DEVEREUX a D.G. WALLACE, 1994. Injectable collagen as a pH-sensitive hydrogel. *Biomaterials*. **15**(12), 985-995. DOI: 10.1016/0142-9612(94)90079-5. ISSN 01429612.